

Effekter av ligander til lever-X-reseptor (LXR) på lipidmetabolisme i humane skjelettmuskelceller ved normoglykemi og hyperglykemi

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Sissel Leirvik



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

UNIVERSITETET I OSLO
Oktober 2008

Veiledere

Professor Arild Chr. Rustan

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Nina Pettersen Hessvik

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden fra august 2007 til oktober 2008.

Det er flere personer som har medvirket til at det siste året på farmasistudiet ble et hyggelig år. Først og fremst vil jeg takke mine veiledere professor Arild Rustan og ikke minst professor Hege Thoresen for et spennende og lærerikt år. Takk for alle gode råd og konstruktive tilbakemeldinger underveis i prosessen. Takk for inspirasjon og entusiasme. En ekstra takk til Hege for hjelp under skriveprosessen og for å ha vist meg hvordan GraphPad skulle brukes. Døren din har alltid vært åpen for store og små spørsmål.

Jeg vil også takke min veileder stipendiat Nina Pettersen Hessvik for å ha hjulpet meg med lipidfiltrasjon og PCR, og for å ha gitt svar på det jeg har lurt på underveis.

En stor takk rettes også til Mari-Ann Baltzersen for å ha guidet meg inn i celleverdenen og for ditt smittende humør. Uten deg hadde det ikke blitt noen celledyrking.

Takk for hyggelige og lærerike møter hos ”Muskelbunten”.

Jeg vil også takke Aase Camilla, Berit, Helle og Line for fire gode år på FI. Takk for de hyggelige lunsjene, de gode ”husmor”-rådene og for å ha vært mine gode venner og samtalepartnere.

Sist, men ikke minst, en kjempestor takk til min datter Charlotte og min kjære Terje for å ha støttet meg underveis under studiene og hatt tålmodighet med meg. Jeg er uendelig takknemlig for at dere er en del av livet mitt.

Blindern, oktober 2008

Sissel Leirvik

Innhold

Forord.....	2
Innhold	3
Forkortelser	6
Sammendrag.....	8
1. Innledning	10
1.1 Type 2-diabetes.....	10
1.1.1 Epidemiologi.....	10
1.1.2 Insulin	10
1.1.3 Insulinresistens.....	15
1.1.4 Behandling av type 2 diabetes	15
1.2 Fedme	17
1.2.1 Fettvev og fedme	17
1.2.2 Sammenheng mellom fedme og T2D	17
1.3 Lever X reseptor (LXR)	19
1.3.1 Lever X reseptor er en kjernereseptor	19
1.3.2 LXR agonister.....	21
1.3.3 LXR og kolesterolmetabolisme	23
1.3.4 LXR og lipogenese	25
1.3.5 LXR og karbohydratmetabolisme.....	26
1.3.6 LXR og inflammasjon og immunrespons.....	27
1.3.7 LXR og aterosklerose	28
1.4 Muskelceller	29

1.4.1	Dyrking av muskelceller	29
1.4.2	Skjelettmuskulatur ved fedme og diabetes	29
1.5	Mål for oppgaven.....	30
2.	Materialer og metoder	31
2.1	Materialer.....	31
2.2	Metoder.....	32
2.2.1	Donorkarakteristika	32
2.2.2	Celledyrking.....	32
2.2.3	Oksidasjon og cellassosiasjon av fettsyrer	33
2.2.4	Måling av syreløselige metabolitter (ASM)	34
2.2.5	Måling av proteiner.....	35
2.2.6	Lipidfiltrasjon	35
2.2.7	RNA-isolering og analyse av genekspressjon med Real Time Poly Chain Reaction (RT-PCR).....	36
2.3	Statistisk analyse.....	38
3.	Resultater.....	39
3.1	Utsåing av celler	39
3.2	Oksidasjon og cellassosiasjon av fettsyrer	43
3.3	Lipidfiltrasjon	48
3.4	Real time PCR	51
4.	Diskusjon.....	54
4.1	Dyrking av skjelettmuskelceller	54
4.2	Oksidasjon og celleassosiasjon av fettsyrer	55
4.2.1	Celleassosiasjon av PA og OA	55
4.2.2	Oksidasjon av PA og OA.....	57

4.3	Lipidfiltrasjon	59
4.4	Genekspresjon	60
4.5	Normoglykemi versus hyperglykemi	61
4.6	Hva kan LXR-ligander brukes til?	62
5.	Oppsummering og konklusjon	63
	Kildeliste	64
	Vedlegg	68
	Utsåingsmedium (M1)	68
	Proliferasjonsmedium (M2)	68
	Differensieringsmedium (M3)	68
	Forsøksmedium I (M4)	68
	Forsøksmedium II (M5)	69
	Høstebuffer- PBS buffer (B1)	69
	Reaksjonsblanding til cDNA syntese (M6)	69
	Reaksjonsblanding til RT-PCR (M7).....	70

Forkortelser

ABC	ATP-Binding Cassette
ACC	acetyl- CoA-karboksyase
ASM	acid soluble metabolites = syreløselige metabolitter
ATP	adenosin trifosfat
CA	celleassosiert
cDNA	komplementært deoksyribonukleinsyre
CETP	cholesterylester transfer protein
ChREBP	karbohydrat-respons-element-bindende protein
CoA	koenzym A
CPT-1	Carnitine Palmitoyltransferase-1/carnitine acyltransferase-1
CYP	cytokrom P450
DDP-4	dipeptidyl peptidase-4
FAS	fatty acid synthase
FXR	farnesoid-X-reseptor
GAPDH	glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GIP	gastrisk inhibitorisk polypeptide/ glukose-afhængig- insulinotropisk- peptide
GLP-1	glukagon-liknende peptid-1
GLUT	glukosetransportør
HG	hyperglykemi
HDL	high density lipoprotein
HRE	hormon-responsivt-element
IL	interleukin
IRS	insulin reseptorsubstrat
KMI	kropsmasseindeks
LBD	ligandbindende domene

LCAT	lecitin: kolesterol acyltransferase
LXR	lever-X-reseptor
LXRE	lever-X-reseptor-respons-element
mRNA	messenger ribonucleic acid
NG	normoglykemi
NR1H2/3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2/3 (=LXR)
OA	oljesyre
PA	palmitinsyre
PEPCK	fosfoenolpyruvat-karboksykinase
PI (3)K	fosfoinositid-3 kinase
PPAR	peroksisom-proliferator-aktiverede reseptorer
RNA	ribonukleinsyre
ROS	reaktive oksygenspecier
RXR	retinoid-X- reseptor
R	22(R)-hydroksykolesterol
S	22(S)-hydroksykolesterol
SCD-1	stearoyl-CoA Desaturase-1
SREBP	sterol-regulatorisk-element-bindende proteiner
T	T0901317
TAG	triacylglycerol
TNF α	tumor nekrosefaktor α
T2D	type 2-diabetes
UGT 1A3	UDP-glukuronyltransferase 1A3
VLDL	very low density lipoprotein
11 β -HSD	11 β -hydroksysteroid-dehydrogynase-type-1
22(R)-HC	22(R)-hydroksykolesterol
22(S)-HC	22(S)-hydroksykolesterol

Sammendrag

Type 2-diabetes skyldes insulinresistens og/eller nedsatt insulinproduksjon. Det resulterer blant annet i hyperglykemi og påfølgende hyperinsulinemi, høye triglyserider og redusert "high density lipoprotein" (HDL)-kolesterol.

Fedme er en av årsakene til utvikling av insulinresistens. Økte nivåer av frie fettsyrer i sirkulasjonene medfører hemmet glukoseopptak, glykogensyntese og glukoseoksidasjon, samt øker hepatisk frisetting av glukose. Økt akkumulering av ulike lipider i skjelettmuskulatur og lever sees også. Inflammasjon og frisetting av cytokiner fra fettvev kan bidra til insulinresistens ved at funksjonen til ulike proteiner i insulinsignalleringsveien endres.

Lever-X-reseptor (LXR) er en transkripsjonsfaktor som tilhører kjernereseptorfamilien. Den fins i to ulike isoformer; LXR α fins hovedsaklig i lever, fettvev, tarm, nyrer og makrofager, mens LXR β er vidt utbredt i mange vev og organer. LXR regulerer transkripsjonen av en rekke gener involvert i metabolismen av kolesterol, lipider og karbohydrater. Oksysteroler, som for eksempel 22(R)-hydroksykolesterol (22(R)-HC), er naturlige ligander til LXR. Glukose har også vært nevnt som en ligand, men er noe omstridt. T0901317 og 22(S)-hydroksykolesterol (22(S)-HC) er syntetiske ligander som blir benyttet som modellsustanser.

Vi har undersøkt hvordan T0901317, 22(R)-HC og 22(S)-HC påvirker opptak, metabolisme og lagring av radioaktiv palmitinsyre (PA) og oljesyre (OA) i humane myotuber, og mRNA-ekspressjon av ABCA1 (involvert i revers kolesteroltransport og kolesterolabsorpsjon) og SCD-1 (involvert i triglyseridsyntese) både ved normoglykemi (NG) og hyperglykemi (HG).

Vi observerte en økt mengde celleassosierte fettsyrer og økt lipidakkumulering etter behandling med T0901317. Ved NG ble oksidasjonen av PA og OA økt etter samme behandling, og dette kan redusere sjansen for et lipotoksisk miljø. 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317, hemmet økt mengde celleassosierte fettsyrer. Samtidig ble også oksidasjonen av fettsyrene redusert. Det er fra våre forsøk vanskelig å si hva

denne kombinasjonen hadde å si for akkumulering av lipider fra acetat og PA, mens det for OA ble en hemmet effekt ved NG. Vi fant at T0901317 øker transkripsjonen av ABCA1 og beskytter derfor cellene mot akkumulering av kolesterol. Den økte transkripsjonen av SCD-1 er imidlertid uønsket, da triglyserider kan akkumuleres i skjelettmuskulaturen og forverre insulinresistens.

22(S)-HC økte ikke ekspresjonen av verken ABCA1 eller SCD-1 sammenliknet med ubehandlede celler. Det ble heller ikke økt mengde celleassosiert PA etter behandling med 22(S)-HC. Ved NG fant vi økt oksidasjon av fettsyrene, men ikke ved HG.

22(S)-HC økte lipidakkumuleringen fra PA (NG) og OA (NG). Det kan tyde på at 22(S)-HC kan gi en bedre lipidprofil enn T0901317, men flere forsøk må gjøres.

22(R)-HC er en endogen ligand som i våre forsøk ga en økt mengde celleassosiert PA ved NG, og økt mengde OA både ved NG og HG. Oksidasjonen av PA og OA ved NG var økt. 22(R)-HC hadde ingen innvirkning på lipidakkumulering fra acetat, PA eller OA.

Gjennomsnittet av de ulike forsøkene viste ikke signifikante forskjeller på lipidmetabolismen ved NG og HG. LXR-ligander har betydelige potensialer for mange ulike terapiområder. Utfordringen blir å finne selektive ligander som ikke medfører økt lipogenese, hypertriglyseridemi eller fettlever.

1. Innledning

1.1 Type 2-diabetes

1.1.1 Epidemiologi

Diabetes mellitus er en kronisk stoffskiftesykdom med hyperglykemi og andre metabolske forstyrrelser. Type 2-diabetes (T2D) skyldes insulinresistens og/eller nedsatt insulinproduksjon. I Norge har om lag 225 000 mennesker T2D, og av de er det bare halvparten som faktisk vet at de har sykdommen. Hvert år blir det diagnostisert 6-7000 nye tilfeller med T2D i Norge, og i løpet av de siste femti årene er antallet firedoblet [1]. På verdensbasis er det estimert at 180 millioner har diabetes (90% av disse T2D). Dette forventes doblet innen 2030 [2].

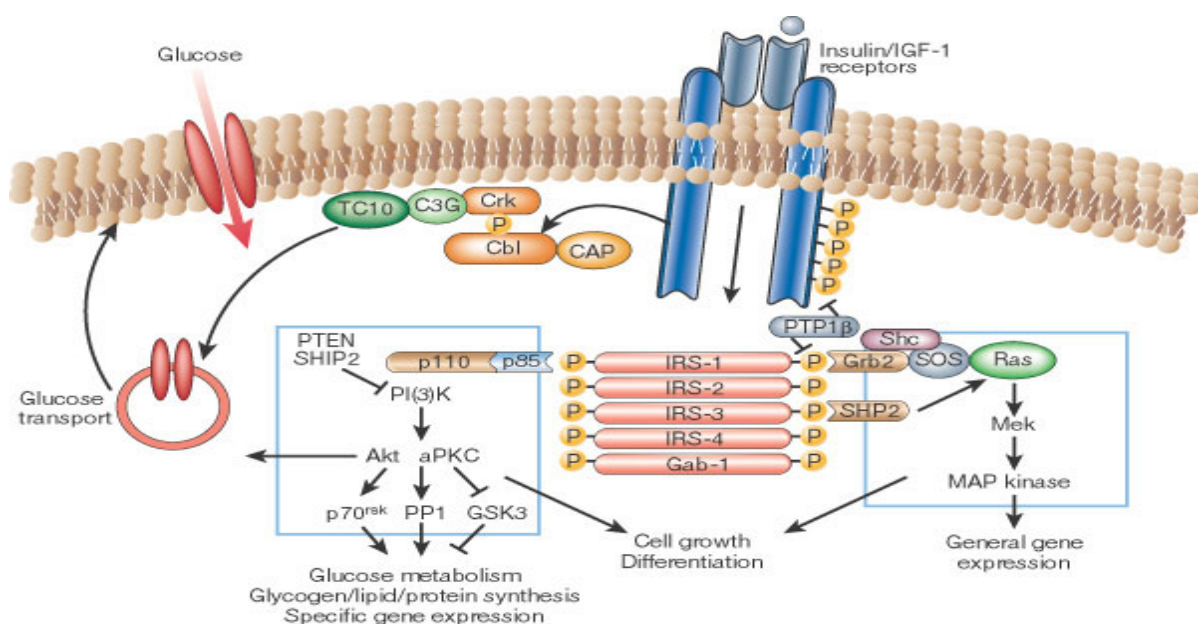
1.1.2 Insulin

Syntese, sekresjon og regulering

Insulin syntetiseres som preproinsulin i de Langerhanske øyer i bukspyttkjertelen (pankreas) og omdannes til insulin og C-peptid som lagres i B-cellen. Sekresjon av insulin reguleres først og fremst av glukosekonsentrasjonen i blodet, men også gastrointestinale hormoner som gastrin, sekretin, gastrisk-inhibitorisk-polypeptid /glukose avhengig insulinotrop polypeptid (GIP), glukagon-liknende-peptid (GLP) og cholesytokinin. I tillegg kan aminosyrer, fettsyrer, det parasympatiske nervesystemet og legemidler som virker på sulfonylurea-reseptoren medføre økt insulinsekresjon [3]. I de senere årene er det også utviklet legemidler som påvirker inkretinsystemet, det medfører stimulering av insulinsekresjonen og undertrykking av glukagonsekresjonen. I denne gruppen fins det to ulike angreppunkter; GLP-1-reseptor-agonister og hemmere av dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) (et enzym som inaktiverer GLP-1 og GIP) [4].

Virkemekanisme

Insulinreseptoren består av to ekstracellulære α -enheter med bindingssted for insulin og to transmembrane β -enheter med tyrosinkinase-aktivitet. Denne aktiviteten er hemmet av α -enhetene, men blir aktivert ved binding av insulin. Autofosforylering av β -enhetene og konformasjonsendringer katalyserer fosforylering av cellulære proteiner som for eksempel IRS-proteiner, Shc og Cbl. Etter tyrosinfosforylering av disse proteinene kan de interagere med og aktivere ulike signalmolekyler som for eksempel PI(3)K, RAS og MAP-kinase kaskade og TC10 (se figur 1.1). Detaljer om proteiner og signalveier tas ikke med her, men slutteffektene av kaskadene er regulering av glukose-, lipid-, og proteinmetabolisme, samt påvirkning av celledvekst, differensiering og generell genekspressjon [5].



Figur 1.1 Insulinreseptoren og insulinsignaleringsen.

Insulinreseptoren er en tyrosinkinase som undergår autofosforylering, og katalyserer fosforyleringen av cellulære proteiner som medlemmer av insulin-reseptor-substrat-1 (IRS)-familien, Src-homolog-og-collagen (Shc) og Casitas-b-lymfoma (Cbl). Etter tyrosinfosforylering kan disse proteinene interagere med signalmolekyler gjennom deres Src-homologi-2 (SH2)-domener, noe som resulterer i ulike serier av signalbaner, inkludert aktivering av PI(3)K og nedstrøms phatidylinositol- (PtdIns) (3,4,5) P_3 -avhengige protein-kinaser, ras og mitogen-aktivert-protein (MAP)-kinase kaskaden, og Cbl/katabolit-aktivator-protein (CAP) og aktivering av TC10. Disse banene virker til sammen for å koordinere reguleringen av vesikkel trafikken, protein syntesen, enzym-aktivering og inaktivering og genekspressjon, noe som resulterer i regulering av glukose-, lipid- og proteinmetabolisme. Reproduert fra Saltiel et al [5].

Regulering av glykogensyntese

Insulin regulerer mengden glykogen som kan lagres i cellene ved å påvirke glukosetransporten inn i cellen. I muskel og fettvev skjer dette via økt translokering av glukosetransportøren GLUT-4 fra golgiapparatet til cellemembranen, mens det i leveren skjer via GLUT-2. I tillegg aktiverer insulin enzymer involvert i selve glykogensyntesen, for eksempel glykogen syntase [5].

Regulering av glykogenolyse og glukoneogenese

Ved faste kan glukose produseres i leveren enten via glykogenolyse eller glukoneogenese (se figur 1.2). Spalting av glykogen (glykogenolyse) skjer under kortvarig og opp til noen timers faste. Insulin undertrykker glykogenolysen 1-2 timer etter matinntak hos friske personer. Ved lengre tids faste (12-14 timer) blir glykogenlagrene tømt og leveren syntetiserer glukose fra pyruvat, laktat, glyserol eller glukogene aminosyrer (glukoneogenese). Økt glukoneogenese skjer også ved lave insulinkonsentrasjoner (ved type 1-diabetes) og ved insulinresistens (T2D og fedme). Insulin spiller en viktig rolle i leveren ved å hemme glukoneogenesen etter måltider. Dette skjer ved å hemme transkripsjonen av genet som koder for fosfoenolpyruvat karboksykinase (PEPCK), det hastighetsregulerende trinnet i glukoneogenesen. Insulin hemmer også genet som koder for glukose-6-fosfatase, det siste trinnet i både glykogenolysen og glukoneogenesen. Andre hormoner som glukagon og glukokortikoider kan også påvirke transkripsjonen av glukogene enzymer [6].

Insulin hemmer vanligvis lipolysen, men det viscerale fett er mindre sensitiv for insulin enn subkutant fett og dermed blir det økt mengde fettsyrer som kan entre leveren. Fettsyrer som entrer leveren via portvenen kan stimulere glukoseproduksjonen [5]. Sentrale mekanismer i hjernen detekterer glukose- og lipidnivået og kan også regulere leverens glukosemetabolisme via vagusnerven [6].

Regulering av lipidsyntese og degradering

Triglyserider fra dietten blir transportert fra tarmen til leveren via kylomikroner. Overskudd av triglyserider kan lagres som lipiddråper i leveren. I leveren kan

triglyserider også syntetiseres fra fettsyrer og glyserol. Fettsyrekildene er ikke-foretrede fettsyrer fra plasma eller de blir syntetisert i lever via *de novo* lipogenese. Hepatisk lipogenese skjer i flere trinn; glukose omdannes til pyruvat i Krebs syklus i mitokondriene. Citrat dannet i samme prosess, omdannes til acetyl-CoA i cytosol ved hjelp av ATP-citrat-lyase. Acetyl-CoA omdannes ved hjelp av acetyl-CoA karboksylase-1 (ACC-1) til malonyl-CoA, som igjen omdannes til ulike langkjedede fettsyrer ved hjelp av fettsyre-syntase (FAS).

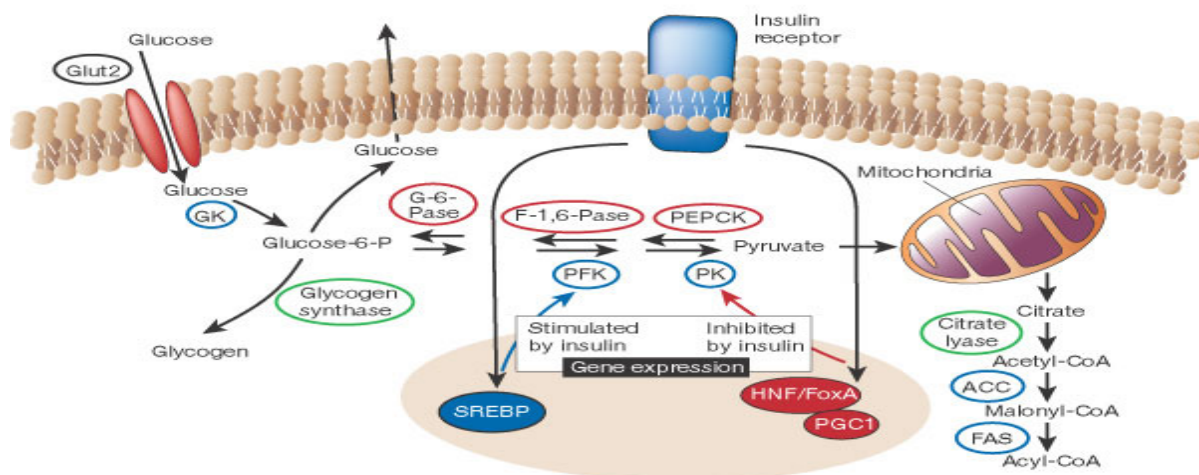
Triglyserider kan lagres i fettvev, eller metaboliseres til fettsyrer og brukes som energikilde. Oksidasjon av fettsyrene foregår blant annet i mitokondriene. Fettsyrene blir først omdannet til fatty-acyl-CoA i cytoplasma og entrer mitokondriene ved hjelp av carnitin-acyltransferase-1 (CPT-1) [7].

Insulin fremmer syntese og hemmer degradering av lipider. Studier tyder på at insulin påvirker ekspresjonen av sterol-respons-element-bindende proteiner (SREBPs) som aktiverer ekspresjonen av minst 30 ulike gener involvert i syntese og opptak av fettsyrer, triglyserider, kolesterol og fosfolipider [5].

Insulin og transkripsjonsfaktorene SREBPs og karbohydrat-respons-element-bindende proteiner (ChREBPs), stimulerer lipogene gener som ACC-1 og FAS. SREBPs aktiverer ACC-2 som produserer malonyl-CoA i mitokondriemembranen. Økning i malonyl-CoA hemmer CPT-1 i høye konsentrasjoner og dermed hemmes β -oksidasjon av fettsyrer og fettsyrer akkumuleres.

Hyperglykemi aktiverer ChREBPs, som induserer genekspressjonen av et viktig enzym i glykolysen; lever-type-pyruvat-kinase. Lever-type-pyruvat-kinase omdanner fosfoenolpyruvat til pyruvat, som entrer Krebs syklus og det dannes citrat. Citrat er en kilde til acetyl-CoA brukt i fettsyre-syntese. Det betyr at glukose omdannes til fettsyrer ved energioverskudd [7]. I fettceller blir lipolysen primært hemmet ved at insulin hemmer enzymet hormonsensitivlipase [5].

Insulins effekter på høymetabolske vev er oppsummert i tabell 1 (reprodusert fra [3]).



Figur 1.2 Insulineffekter i leveren.

Insulin stimulerer forbruk og lagring av glukose som lipider og glykogen i leveren, mens den undertrykker glukosesyntese og -frisetting. Dette oppnås gjennom en koordinert regulering av enzymsyntese og aktivitet. Insulin stimulerer ekspresjonen av gener som koder for enzymer i glykolyesen og fettresyntesen (blå farge), mens insulin hemmer ekspresjonen av gener som koder for glukoneogene enzymer (rød farge). Disse effektene medieres av en serie transkripsjonsfaktorer og kofaktorer, inkludert sterol-regulatorisk-element-bindene protein (SREBP)-1, hepatisk kjernefaktor (HNF)-4, "forkhead" protein familien (Fox) og PPAR γ - koaktivator-1 (PGC1). Insulin regulerer også aktiviteten til enzymer som glykogen syntase og citrate lyase (grønn farge), gjennom endringer i fosforyleringstilstanden. GK, glukokinase; Glukose-6-P, glukose-6-fosfatase; G-6-Pase, glukose-6-fosfatase; F-1,6-Pase, fruktose-1,6-bisfosfatase; PEPCK, fosfoenolpyruvat karboksykinase; PFK, fosfofruktokinase; PK, pyruvat kinase; ACC, acetyl-CoA karboksylase; FAS, fettresyntase. Reproduert fra Saltiel et al [5].

Tabell 1.1: Insulins effekt på lever-, fett- og muskelceller

Type metabolisme	Leverceller	Fettceller	Muskel
Karbohydrat-metabolisme	↑↓ Glukoneogenese ↓ Glykogenolyse ↑ Glykolyse ↑ Glykogenese	↑ Glukoseopptak ↑ Glycerolsyntese	↑ Glukoseopptak ↑ Glykolyse ↑ Glykogenese
Fettmetabolisme	↑ Lipogenese ↓ Lipolyse	↑ Triglyseridsyntese ↑ Fettresyntese ↓ Lipolyse	
Proteinmetabolisme	↓ Nedbrytning av proteiner		↑ Aminosyreopptak ↑ Proteinsyntese

1.1.3 Insulinresistens

Begrepet insulinresistens brukes om en tilstand der forhøyede insulinnivåer kreves for å gi en normal metabolsk respons, eller normale insulinnivåer gir inadekvat metabolsk respons. Insulinresistens kan være sentral (lever) eller perifer (skjelettmuskel og fettvev). Insulins hemming av hepatisk glukoseproduksjon blir redusert, stimulering av glukoseforbruk i skjelettmuskel og fettvev blir dårligere, og antilipolytisk påvirkning av fettvev reduseres. Dette resulterer blant annet i hyperglykemi og påfølgende hyperinsulinemi, høye triglyserider og redusert HDL-kolesterol [7].

Insulinresistens kan oppstå ved nedsatt reseptorkonsentrasjon og kinaseaktivitet, nedsatt konsentrasjon og fosforylering av intracellulære proteiner som IRS-1 og IRS-2, nedsatt PI(3)-kinase aktivitet, nedsatt translokasjon av glukosetransportører eller nedsatt aktivitet av intracellulære enzymer [5]. Forlenget eksponering av insulin ved hyperinsulinemi kan medføre degradering av IRS-proteiner og dermed hemmes videre kaskade. Oppregulering av protein-tyrosin-fosfataser kan virke som negative regulatorer av insulinmedierte baner og bidra til insulinresistens. Polymorfisme eller mutasjoner som inaktiverer genet for glukosetransportøren GLUT-4 er ikke assosiert med insulinresistens. Proinflammatoriske cytokiner og akutt-fase-reaktanter synes derimot å ha en korrelasjon med insulinresistens [8].

1.1.4 Behandling av type 2 diabetes

Ved T2D er mange overvektige, slik at kostholdsendringer som medfører vekttap blir viktig. Fysisk aktivitet bidrar til å senke blodsukkeret og kan bidra til vektreduksjon. Hos yngre personer er behandlingsmålet å forebygge mikrovaskulære komplikasjoner og aterosklerotisk sykdom. Hos eldre over 75 år er primærmålet symptomreduksjon. Hvis blodsukkernivåene fortsatt ligger over ønsket verdi etter livsstilsendringer, er behandlingen perorale antidiabetiske legemidler og eventuelt legemidler som regulerer blodtrykk og lipidprofilen. De perorale antidiabetiske legemidlene som er på det norske markedet per i dag har ulike angrepppunkter. De kan redusere

oppsugingshastighet av karbohydrater fra tarmen (akarbose), bedre insulinvirkningen (metformin), redusere insulinresistens i fettvev, leverceller og skjelettmuskulatur (PPAR γ -agonister), øke insulinproduksjonen i β -cellene (sulfonylureaderivater, repaglinid, nateglinid) eller påvirke inkretinsystemet (GLP-1 agonister og DPP-4 hemmere). Det fins også en rekke kombinasjonspreparater av disse på markedet. Uønskede bivirkninger som blant annet alvorlig hypoglykemi, gastrointestinale forstyrrelser, væskeretensjon og hjertesvikt, samt interaksjoner med andre legemidler, gjør at det er behov for nye, effektive og sikre antidiabetiske legemidler på markedet. Over tid vil som oftest den endogene insulinproduksjonen avta, slik at det må gis injeksjoner av insulin i tillegg [9].

1.2 Fedme

1.2.1 Fettvev og fedme

Fettvev er et endokrint organ og en viktig regulator for både metabolisme og inflammasjon. Fettvev består av lipidfylte adipocytter holdt sammen i et nettverk av kollagen og inneholder også celletyper som fibroblastiske bindevevsceller, leukocytter, makrofager og pre-adipocytter (uten lipider). 60-85% av vekten til hvitt fettvev består av lipider (90-99% er triglyserider). Den øvrige delen er frie fettsyrer, diglyserider, kolesterol og fosfolipider. Fettvevet kan vokse på grunn av økt størrelse av adipocytter (lipider akkumuleres inni cellen, dette er reversibelt) eller antall adipocytter (irreversibelt). Adipocytter tar opp fettsyrer og omdanner de til triacylglyserol ved kalorioverskudd og frigjør ikke-forestrede fettsyrer til sirkulasjonen ved faste, sult eller trening [7]. Personer som har en kroppsmasseindeks (KMI) (vekt [kg]/ høyde² [m]) på over 25 regnes som overvektige, mens KMI over 30 kategoriseres som fedme.

1.2.2 Sammenheng mellom fedme og T2D

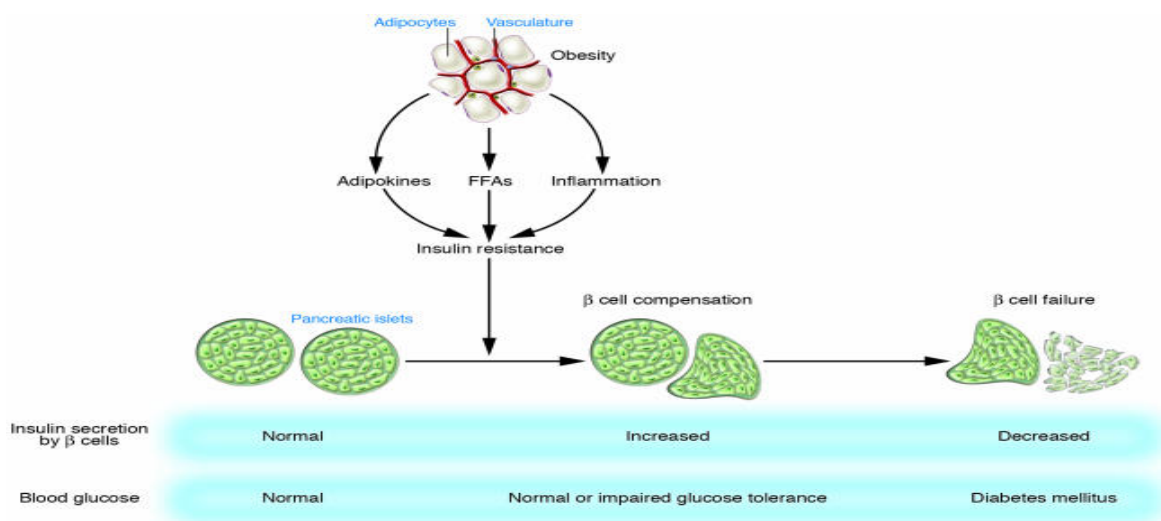
Frisetting av fettsyrer fra fettvev er normalt regulert i forhold til energibehovet i vevene. Ved fedme kan denne frisettingen komme ut av kontroll og det blir høye konsentrasjoner av frie fettsyrer i plasma [10].

Økte nivåer av frie fettsyrer i sirkulasjonen bidrar til insulinresistens ved fedme og T2D. De frie fettsyrene hemmer glukoseopptak, glykogensyntese og glukose oksidasjon, samt øker hepatisk frisetting av glukose. De kan også redusere insulinstimulert fosforylering av IRS-1 og påfølgende PI(3)-kinaseaktivitet. Frie fettsyrer medfører også akkumulering av metabolitter fra fettsyrer (for eksempel diacylglyserol, fatty-acyl-CoA og ceramider) i skjelettmuskel og lever [5].

Insulinresistens gir hyperglykemi og pankreas svarer med å produsere mer insulin. Hyperinsulinemi resulterer i økt lagring av triglyserider og det hele blir en ond sirkel [8].

Fedme kan lede til en inflammasjonsprosess i lever og fettvev. Infiltrasjon av makrofager og frisetting av cytokiner som tumor-nekrose-faktor α (TNF α), interleukin-1 (IL-1) og interleukin-6 (IL-6), setter i gang en kaskade som endrer funksjonen til mange proteiner involvert i insulinsignalerings [11]. Et eksempel er TNF α som medfører fosforylering av serinenheter på IRS-1 molekylet istedenfor tyrosinfosforylering. Dette resulterer i nedsatt insulinreseptor kinaseaktivitet og insulinresistens [5]. Flere ulike adipokiner kan også bidra til insulinresistens [12], men omtales ikke her. Figur 1.3 viser utviklingen av T2D.

En av teoriene som forsøker å forklare sammenhengen mellom fedme, inflammasjon og diabetes, er basert på evolusjonen. Kroppens evne til å overleve høyt stress, infeksjon og sult, blir økt ved perifer insulinresistens, for da blir tilgjengelig glukose reservert til hjernen [13].



Figur 1.3: Utvikling av type 2-diabetes

Insulinresistens assosiert med fedme induseres av adipokiner, frie fettsyrer (FFA) og kronisk inflammasjon i fettvev. β -cellene i pankreas kompenserer for insulinresistens med hypersekresjon av insulin. Etter et visst punkt, vil β -celle kompensasjonen etterfølges av β -celle svikt, og diabetes blir resultatet. Reproduert fra Kasuga [12].

1.3 Lever X reseptor (LXR)

1.3.1 Lever X reseptor er en kjernereseptor

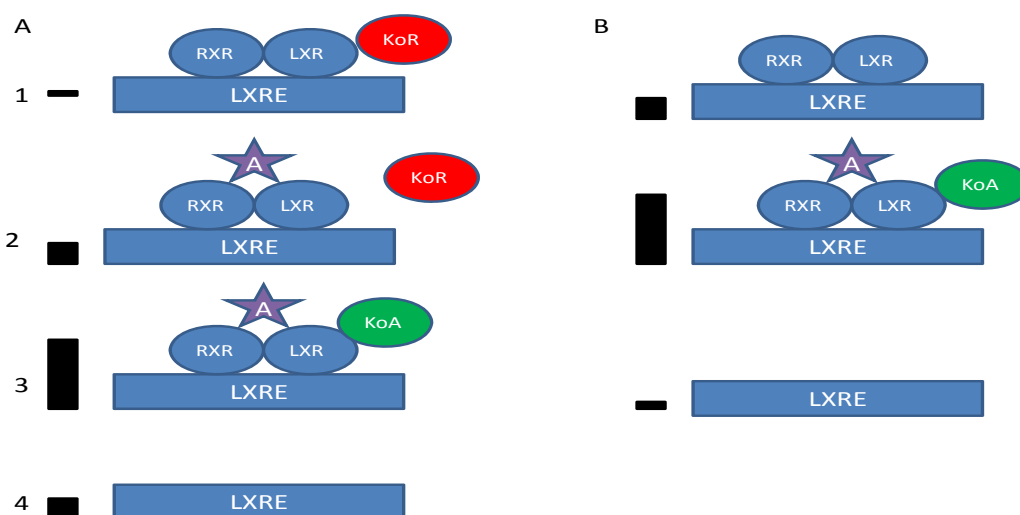
Det fins fire ulike grupper kjernereseptorer; steroid-hormon-reseptorer, dimere "orphan"-reseptorer, RXR heterodimerer og monomere "orphan"-reseptorer. "Orphan" betyr i denne sammenhengen at ligandene fremdeles er ukjente. Felles for kjernereseptorene er strukturen med en variabel N-terminal region, en DNA-bindende region med zink fingre som omgir DNA-heliksen i spesifikke sekvenser som kalles hormonresepsiv element (HRE), en variabel region, et ligandbindende domene (LBD) og til slutt en variabel C-terminal-region [14]. Kjernereseptorene er lokalisert i cytosol i cellen og migrerer til kjernen ved tilstedeværelse av ligand [3]. Ved binding av ligand vil reseptoren endre konformasjon i LBD-regionen og korepressorer vil dissosiere og kofaktorer rekrutteres. Kofaktorene og korepressorene er proteiner som er viktig for at kjernereseptorene skal kunne regulere transkripsjonen til sine spesifikke målgener [15].

LXR finnes som to isoformer, α (=NR1H3) og β (=NR1H2). LXR α fins hovedsaklig i lever, fettvev, tarm, nyrer og makrofager, mens LXR β er vidt utbredt i mange organer [15]. LXR α kan videre inndeles i 3 varianter på grunn av ulik promotor bruk og alternativ splicing av mRNA. Dette gir utslag i ulik transkripsjonsaktivitet i ulike vev [16].

LXR α og LXR β danner heterodimerer med retinoid-X- reseptor (RXR). Denne dimeren kan aktiveres av både LXR-ligander og RXR-agonisten 9-cis-retinoid syre. Også andre kjernereseptorer danner dimerer med RXR; peroksisom-proliferator-aktivert reseptor (PPAR), vitamin-D-reseptor, thyroid-reseptor og farnesoid-X-reseptor (FXR). LXR/RXR-komplekset translokeres til kjernen og binder seg til LXR responselement (LXRE) i promotorregionen til målgenene og vil sammen med koaktivator/korepressor- proteiner regulere genekspressjonen.

Virkemekanismen til LXR kompliseres ved at LXR kan stimulere transkripsjonen av gener også i fravær av ligand. Modellen for stimulering uten tilstedeværelse av ligand

er at LXR/RXR heterodimeren kan stimulere transkripsjonen fordi korepressorer ikke er til stede. LXR-ligander kan også hemme transkripsjonen av gener ved å stimulere proteiner som hemmer transkripsjonen eller destabiliserer mRNA, binding av LXR til andre transkripsjonsfaktorer som hemmer deres aktivitet, konkurranse om RXR med andre transkripsjonsfaktorer som danner dimerer med RXR, konkurranse om kofaktorer eller at LXR/RXR heterodimeren bindes til LXRE som overlapper med andre responselementer for andre kjernereseptorer [17].



Figur 1.4: To modeller for regulering av genekspressjon av LXR/RXR heterodimeren.

A) LXR/RXR uten ligander, kan aktivt undertrykke transkripsjonen (1) ved å rekruttere korepressorer (KoR). Agonistbinding (A) medfører dissosiasjon av korepressor, noe som leder til moderat stimulering av transkripsjonen (2), og senere rekruttering av koaktivatorer (KoA) gir maksimal stimulering av transkripsjonen. Fjerning av aktiv suppresjon med LXR^{knockout} mus (4) gir moderat høyere ekspressjon av målgener sammen lignet med villfenotype mus.

B) LXR/RXR uten ligand stimulerer transkripsjonen moderat fordi korepressorer ikke er bundet (1). Agonist binding induserer en maksimal stimulering av transkripsjonen ved å rekruttere koaktivatorer (2). I fravær av LXR er transkripsjonen minimal fordi den basiske stimulatoriske effekten av LXR uten ligand er fjernet. Vertikale sorte stolper representerer kvalitativ nivå av genekspressjon. Ulike gener kan reguleres i henhold til modell A eller B. Reprodusert etter Wójcicka [17].

1.3.2 LXR agonister

Oksysteroler

Oksysteroler er monooksygenerte derivater av kolesterol og en av de viktigste gruppene av endogene agonister [17]. Disse produseres i kroppen enten via enzymatiske reaksjoner, ikke-enzymatiske reaktive-oksygen-specier (ROS)-avhengig oksidasjon av kolesterol, eller de tilføres via dietten. De fleste oksysterolene har lik affinitet til LXR α og LXR β , men visse endringer av strukturen kan dreie aktivitetsforholdet mer mot den ene i forhold til den andre.

De enzymatiske deriverte oksysterolene har tre undergrupper:

- Intermediater i kolesterol biosyntese: 24(S),25-epoxykolesterol
- Intermediater i syntesen av steroidhormoner fra kolesterol:
22(R)-hydroksykolesterol (denne er brukt under forsøkene, se figur 1.5 for kjemisk struktur) og 20(S)-hydroksykolesterol
- Derivater fra kolesterol via cytokrom P450 (CYP)-systemet:
24(S)-hydroksykolesterol, 27-hydroksykolesterol, ”cholestenoic acid”,
25-hydroksykolesterol, 4 β -hydroksykolestrol og 7 α -hydroksykolesterol

Oksysteroler dannet ved hjelp av ROS-reaksjoner har svak LXR agonist aktivitet, men kan bidra til patogenesen ved sykdommer der oksidativt stress bidrar, for eksempel aterosklerose. I denne gruppen finner man 7-keto-, 7 α -hydroksy-, 7 β -hydroksy, 5,6-epoksykokolesterol og 3 β ,5 α ,6 β -trihydroksykolestan

Oksysteroler via dietten skyldes oftest ROS-oksidering under lagring, men disse har liten affinitet til LXR og fins i små mengder.

Glukose og glukose-6-fosfat

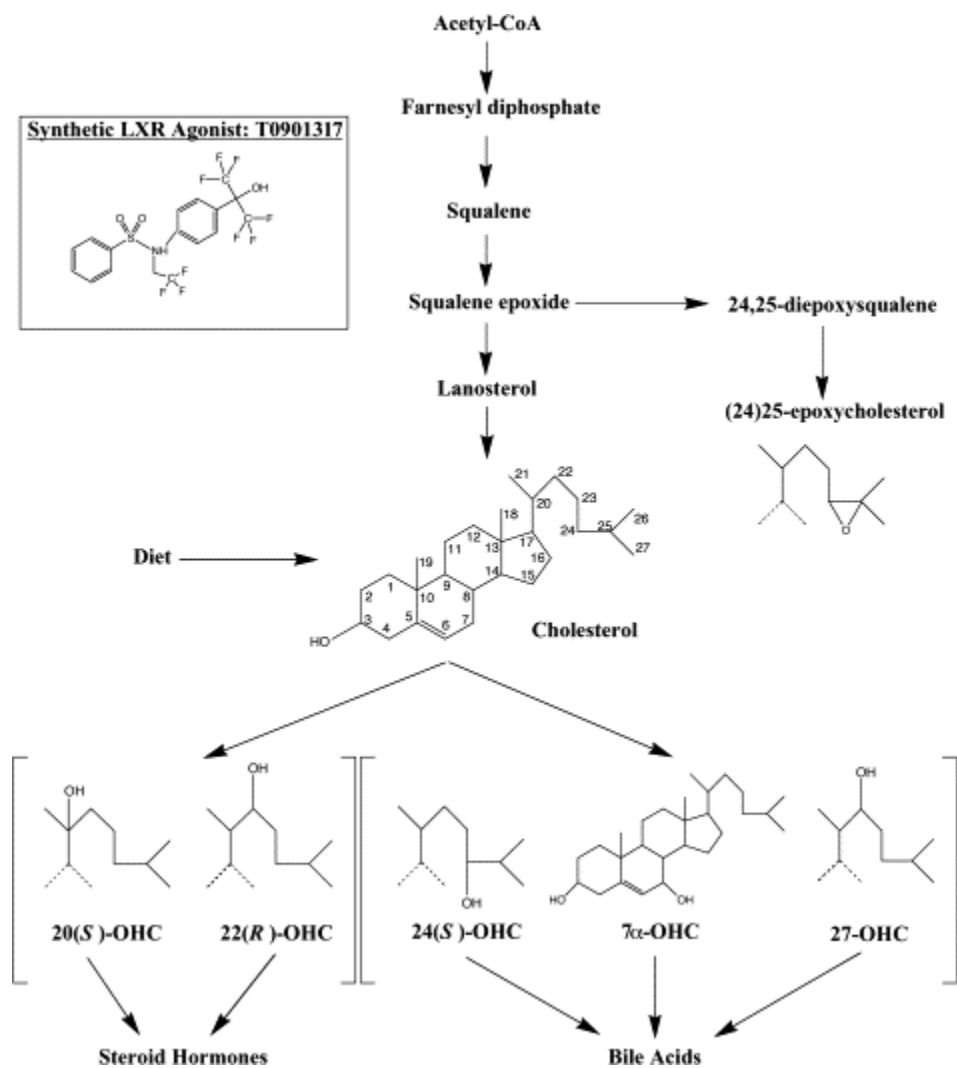
Mitro et al. [18] gjorde i 2007 forsøk med transfekterte HepG2 celler, og fant at D-glukose og D-glukose-6-fosfat kunne bindes til både LXR α og LXR β , og at de induserte rekruttering av koaktivatorer. De fant at D-glukose aktiverte ligandbindene domene til begge isoformene av LXR med samme effektivitet som 22(R)-HC og de

syntetiske agonistene GW3965 og T0901317. D-glukose var mer potent for LXR α enn LXR β . Når glukose ble gitt samtidig med T0901317, ble det en økt rekruttering av koaktivatorer. D-glukose viste seg også å indusere LXR målgener involvert i kolesterolhomeostase; ”ATP-binding-cassette (ABC)-transportører” ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 og ”cholesteryl ester transfer protein” (CETP). Via aktivering av LXR, kunne ekspresjonen av lipogene gener økes, som for eksempel ChREBP og SREBP-1c. Denne studien er senere blitt kritisert (se diskusjon 4.4.5), men var årsaken til at vi gjorde alle forsøkene med både normoglykemi og hyperglykemi.

Syntetiske ligander

- T0901317
- 22(S)-hydroksykolesterol
- GW3965
- Acetylpodcarpic dimer (APD)

T0901317 aktiverer både LXR α og β . I tillegg kan den også aktivere pregnan-X-reseptor og FXR (se figur 1.5 for kjemisk struktur). 22(S)-hydroksykolesterol regnes som en LXR-antagonist. Disse to er brukt under forsøkene og vil bli nærmere omtalt senere. GW3965 har noe høyere affinitet for LXR β enn LXR α og er en mye brukt modellsubstans for LXR, men verken den eller APD blir omtalt nærmere her. Det fins også noen eksogene LXR ligander og noen LXR antagonister som heller ikke blir viet plass her.



Figur 1.5: Endogen syntese av kolesterol og noen oksysteroler (ligander til LXR). Dette er en forenklet framstilling. Strukturen til syntetisk agonist T0901317 er vist for sammenlikning. Reprodusert fra Edwards et al [19].

1.3.3 LXR og kolesterolmetabolisme

Revers kolesteroltransport er prosessen der overskudd av kolesterol fjernes fra lipidrike celler, forestres ved hjelp av lecithin: kolesterol acyltransferase (LCAT) og transporteres til leveren for ekskresjon via gallen, enten uendret som kolesterol eller som gallesyrer [17].

ABC-transportører er den største familien av membran transportproteiner i cellene. Transportøren består av to hydrofobe domener og to ATP-bindene katalytiske

domener (eller kassetter). Når ATP bindes vil de to ATP-bindende domenene dimerisere, og når ATP hydrolyseres vil de dissosiere. Vekslingen mellom binding og hydrolyse av ATP muliggjør transport av molekyler over cellemembraner [20]. ABCA1 er en av medlemmene i ABC-familien. ABCA1 er involvert i aktiv transport av kolesterol, fosfolipider og andre lipofile molekyler over cellemembraner, der de fjernes ved hjelp av HDL eller apolipoproteiner [21]. Kolesterol esterene i HDL-partiklene transporteres til "very low density lipoprotein" (VLDL)-partikler ved hjelp av CETP, og VLDL partiklene sørger for transport til leveren. Dette hindrer at kolesterol akkumuleres i cytosol som kolesterol ester i lipid dråper [22]. ABCA1 hemmer også absorpsjon av kolesterol fra tarmen (se figur 1.6) [23].

ABCA1-transkripsjonen indueres når ligander bindes til RXR, LXR eller begge, og LXR/RXR-heterodimeren bindes til responselementer innen ABCA1-promotoren [21]. Det er også flere andre transkripsjonelle og posttranskripsjonelle mekanismer som regulerer ABCA1-ekspressjonen, men det blir ikke beskrevet nærmere her. Andre ABC-transportører som ABCG1, ABCG5 og ABCG8 er også LXR-målgener. Funksjonen til ABCG1 er effluks av kolesterol til HDL partikler [24], mens ABCG5 og ABCG8 er involvert i å pumpe kolesterol til gallen og hemme absorpsjon av kolesterol fra tarmen [23].

I promotoren til LXR α -genet i humane makrofager er det funnet LXR-respons-elementer, noe som tyder på autoregulering av egen ekspresjon [21]. Alle disse mekanismene bidrar til at kolesterolnivået i cellene reguleres.

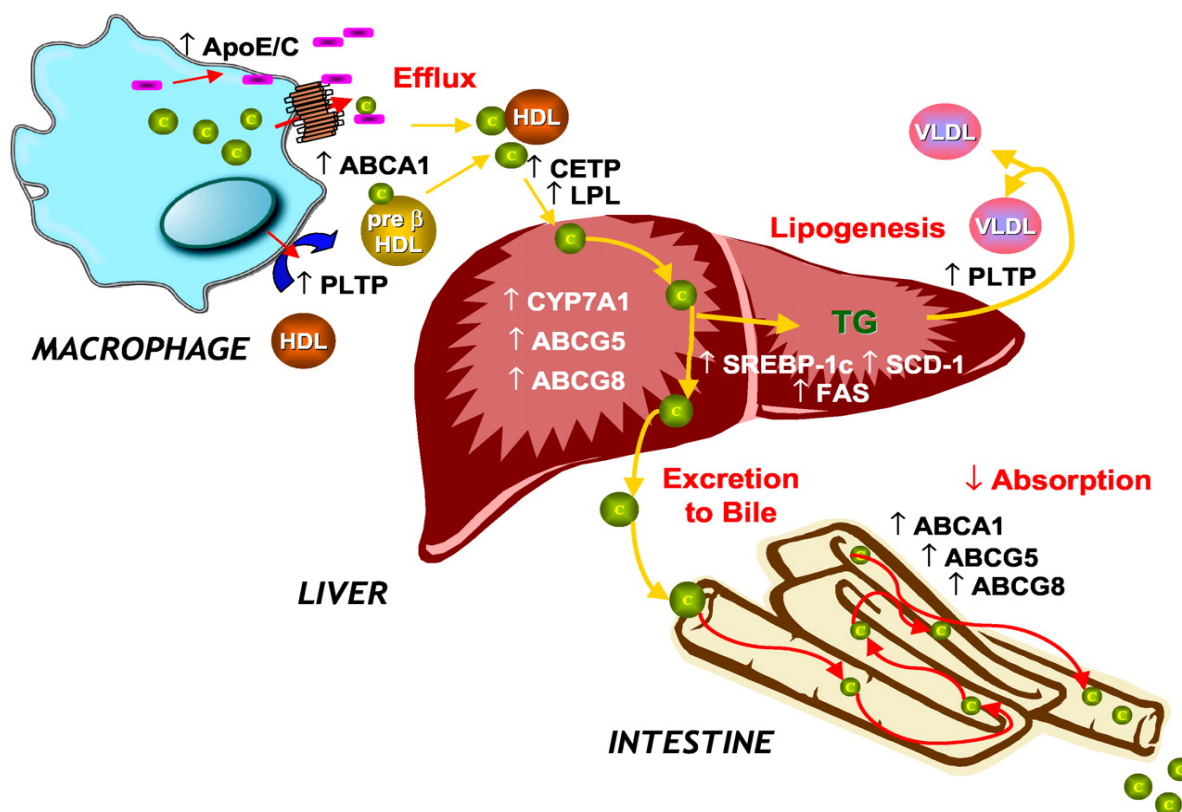
Omdanningen til gallesyrer skjer ved hjelp av cytochrom P450 (CYP)-enzymene CYP7A1, CYP27 og CYP8B1. Ved forhøyede kolesterolkonsentrasjoner vil det dannes mer oksysteroler, som kan bindes til og aktivere LXR α , som igjen kan stimulere transkripsjonen av CYP7A1 hos mus. Dette fører til økt gallesyresyntese og dermed økt ekskresjon av kolesterol (se figur 1.6) [22]. Hos mennesker er det imidlertid ikke funnet LXR-responselement i promotoren til CYP 7A1 gen, så sjansen for at LXR agonister fremmer gallesyresyntese via denne mekanismen er liten hos mennesker [23].

1.3.4 LXR og lipogenese

Fettsyresyntese og påfølgende triglyseridsyntese i lever og fettvev kalles lipogenese. En av de uønskede effektene til LXR-agonisten T0901317 er at den øker konsentrasjonen av triglyserider i plasma og hepatocytter på mus og hamster [25]. Dette kan føre til fettlever og dysfunksjon av leveren. Forsøkene til Chisholm et al [26] viste at økte plasmatriglyserider hos mus var normalisert etter en uke, mens akkumulering av triglyserider i lever vedvarte de fire ukene studien varte. Schultz et al [25] fant at økning i plasmalipider skyldtes LXR-indusering av transkripsjonsfaktorene SREBPs. SREBPs fins som tre isoformer; 1a, 1c og 2. De regulerer lipid homeostase ved å kontrollere ekspresjonen av flere enzymer i syntesen av kolesterol, fettsyrer, triglyserider og fosfolipider. SREBP1c fins i leveren til dyr og aktiverer noen av de viktigste genene som sørger for syntese av fettsyrer; ACC, FAS, stearoyl CoA desaturase-1 (SCD-1) og glycerol-3-phosphate acyltransferase (se figur 1.6). I tillegg kan LXR regulere disse enzymene direkte ved å binde seg til regulatoriske regioner innenfor enzymenes respektive gener [17].

Interessante er også funnene til Kase et al [27], der 22(R)-HC og 22(S)-HC reduserte syntesen av trigacylglycerol (TAG) i forhold til T0901317. I tillegg ble ikke LXR α , SREBP1c eller ABCA1 påvirket av 22(S)-HC, mens 22(S)-HC faktisk reduserte ekspresjonen av SCD-1. SCD-1 er det hastighetsbegrensende enzymet som omdanner mettede fettsyrer til monoumettede fettsyrer, og er et viktig trinn i triglyseridsyntesen.

Ved høy glukosekonsentrasjon blir overskudd av glukose omdannet til lipider. Den glukosesensitive transkripsjonsfaktoren ChREBP stimulerer ekspresjonen av lipogene enzymer og blir selv stimulert av LXR-agonisten T0901317 [4].



Figur 1.6: Rollen til noen LXR målgener ved kolesterolhomeostase og lipogenese. C, kolesterol; TG, triglyserid. Reproduert fra Tontonoz et al [23].

1.3.5 LXR og karbohydratmetabolisme

T0901317 nedregulerer viktige enzymer involvert i glukoneogenesisen i lever; PEPCK (hastighetsbegrensende enzym i glukoneogenesisen), fruktose-1,6-bisfosfatase og glukose-6-fosfatase [28]. Nedregulering av hepatisk glukoneogenese er en viktig rolle for insulin og svikt i denne nedreguleringen sees ved diabetes. Behandling med samme LXR-agonist ga også nedregulering av glykolysen i fettvev [28]. Cao et al [29] sine forsøk på diabetiske musmodeller og insulinresistente rottmodeller, fant at T0901317 senket plasmaglukose og bedret insulinsensitiviteten, og at substansen ikke medførte hypoglykemi hos normale mus. Forsøkene deres bekreftet nedregulering av PEPCK og glukose-6-fosfatase etter behandling med T0901317.

Glukosetransportøren GLUT4 er viktig for insulinmediert opptak av glukose i fettvev og muskel. Insulinresistens medfører nedsatt ekspresjon av GLUT4. LXR-agonisten T0901317 regulerer ekspresjonen av GLUT4 i mus, via LXR-respons-element i promotoren til GLUT4 [30]. Økt glukoseopptak gir imidlertid økt mengde substrat tilgjengelig for triglyseridsyntese. Kase et al [31] publiserte i 2005 forsøk på humane skjelettmuskelceller og blant noen av de interessante funnene derfra kan nevnes; T0901317 økte insulinstimulert glukoseopptak med 30% hos kontroll og type 2-diabetiske myotuber. Glykogensyntesen var redusert med 30% i type 2-diabetiske celler sammenliknet med kontroll. Behandling med T0901317 førte ikke til endringer i gøykogensyntesen. De fant også at ekspresjonen av både GLUT1 og GLUT4 mRNA økte.

β -celler isolert fra pankreas hos rotter og insulin-sekreterende museceller fra pankreas β -celle linje (MIN6-celler) som ble stimulert med T0901317, ga økt glukose- og glukagon-liknende-peptid-1 (GLP-1)-indusert insulinsekresjon og økt syntese av insulin [32].

I tillegg til effektene på glukosemetabolisme, insulinsensitivitet og insulinsekresjon kan T0901317 også påvirke glukokortikoider. Glukokortikoider hemmer insulinsensitivitet og glukosetoleranse ved å stimulere glukoneogenese i lever [33]. Et av enzymene som omdanner inaktive kortikosteroider til biologisk aktive kortikosteroider i fettvev og lever; 11 β -hydroksysteroid-dehydrogenase-type-1 (11 β -HSD), viste redusert ekspresjon ved tilsetting av LXR-ligandene 22(R)-HC, 20(S)-HC og T0901317. I tillegg ble ekspresjonen av glukokortikoid-reseptor redusert.

1.3.6 LXR og inflammasjon og immunrespons

Makrofager spiller en viktig rolle i immunforsvaret. De tar opp patogener og døde celler og responderer på slik stimuli ved å produsere cytokiner, chemokiner og ROS [23]. Gener som for eksempel induserbar nitrogen oxid syntase (iNOS), interleukin-6, cyclooxygenase-2 og matriks metalloproteinase-9 induseres når makrofager

eksponeres for bakterielle komponenter (for eksempel lipopolysakkarider) eller proinflammatoriske cytokiner. LXR-agonistene GW3965 og T0901317 hemmer ekspresjonen av disse genene og flere andre gener involvert i inflammasjon og immunforsvaret [34]. TNF- α tilhører gruppen proinflammatoriske cytokiner. TNF- α har vært knyttet til insulinresistens, muligens ved at den nedregulerer gener tilknyttet insulins virkning. Forsøk har vist at LXR-agonister både hemmer og induserer TNF- α [35].

1.3.7 LXR og aterosklerose

Den aterosklerotiske prosessen er i korte trekk skade på åreveggen etterfulgt av akkumulering av aterogene lipoproteiner i intima i åreveggen. Deretter rekruttering av makrofager som tar opp overskudd av lipider via ”scavenger”-reseptorer, for så omdannes til såkalte skumceller. En kronisk inflammasjonsprosess drevet fram av mediatorer fra skumcellen samt rekrutterte T-celler, gjør at flere makrofager rekrutteres og dermed blir det økt lipiddeponering. Inflammasjonen medfører også remodellering av arterieveggen med innfluks av glatte muskelceller fra media til intima (midterste til innerste delen av åreveggen), deponering av kolesterolrike nekrotiske kjerner og utvikling av en fibrøs kappe [36]. Aterosklerose kan medføre koronar hjertesykdom som angina pectoris, hjerteinfarkt og hjertesvikt [9]. LXR-agonister kan motvirke aterosklerose blant annet ved å indusere gener som øker effluksen av kolesterol fra lipidrike makrofager (revers kolesterol transport), undertrykke inflammasjonen i makrofager og hemme proliferasjon av glatte muskelceller [37].

1.4 Muskelceller

1.4.1 Dyrking av muskelceller

Den kontraktile enheten til en muskel er flerkjernede skjelett-myofibre, som dannes ved fusjon av énkjernede myoblaster. Satelittceller er myogene stamceller in vivo og kan danne både myofibrer og nye satelittceller. Ved en muskelskade kan satelittcellene aktiveres til å dele seg og produsere satelittcelle-deriverte myoblaster. Myoblastene prolifrerer før de differensierer og fusjonerer til myotuber, for deretter og modnes til myofibre [38].

Kulturer av differensierte humane satelittceller blir brukt som modeller for humane skjelettmuskler i metabolske studier. Celler blir sådd ut på brett eller i flasker og tilsatt medier som øker proliferasjonen og induserer differensiering (se kapittel 2.2.2; Celledyrking). De første dagene etter induksjon av differensiering, vil cellene forandre seg. Replikasjonen terminerer, satelittcellene fusjonerer og ekspresjonen av muskelspesifikke proteiner øker [39]. Forsøkene pågår mens cellene fremdeles er i differensieringsprosessen og dette kan påvirke både prosessen og resultatene. Å finne optimale dyrkingsforhold krever en del prøving og feiling, med hensyn til hvilke medier som benyttes og tidsperspektivet for differensiering og tilsetning av substanser som ønskes testet [39].

1.4.2 Skjelettmuskulatur ved fedme og diabetes

Skjelettmuskulaturen er hovedansvarlig for insulinstimulert glukoseopptak [40]. Den oksidative kapasiteten av glukose er redusert ved fedme, diabetes og etter vekttap. Defekter i fettoksidasjonen er også karakteristisk ved diabetes. Et mål på nedsatt fettoksidasjon er høyere respirasjonskvotient [ratio av produsert mengde CO₂ i forhold til konsumert mengde O₂]. Ukropcova et al [40] fant i sine forsøk på humane myotuber at skjelettmuskulaturen har nedsatt metabolsk fleksibilitet ved insulinresistens. Det vil si at muskulaturen har nedsatt evne til å bytte mellom karbohydrat og fettoksidasjon ved faste, og fra fett til karbohydratoksidasjon som respons på insulinstimulering. Glukose kan undertrykke fettoksidasjonen i fravær av

insulin. Nedsatt fettoksidasjon kombinert med en diett rik på fett, gir økt akkumulering av lipider og lipidintermediater og kan skape et lipotoksisk miljø i muskelcellen. De fant at de dynamiske endringene i fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskelcellene gjenspeilte den kliniske fenotypen til celledonoren.

1.5 Mål for oppgaven

Lever-X-reseptor er en transkripsjonsfaktor som er viktig for omsetning av fett og kolesterol i kroppen.

Målene for denne oppgaven var å studere hvordan ulike syntetiske og endogene LXR-ligander kan:

- påvirke fettsyreopptak i skjelettmuskelceller
- påvirke lipidakkumulering i skjelettmuskelceller
- påvirke oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskelceller
- påvirke ekspresjonen av gener involvert i lipid- og kolesterolmetabolismen

Vi ønsket også å undersøke om det var forskjellige effekter av LXR-aktivering på lipidmetabolismen ved normoglykemi og hyperglykemi, på grunn av Mitro et al [18] sin hypotese om at LXR var en glukosesensor.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) med GLUTAMAX-I, føtalt kalveserum (FCS), 0,05 % Trypsin/EDTA, Fungizone® (250µg/ ml amphotericin), Penicillin/Streptomycin løsning 10 000 units/ ml, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS m/Ca²⁺ og Mg²⁺) ble kjøpt fra Gibco (Paisley, UK). Ultraser G ble kjøpt fra BioSeptra SA (Division of CIPHERGEN Biosystems Inc. (Paris, Frankrike). Extracellular matrix (ECM) gel, bovint serum albumin (fetttsyrefri) (BSA), L-carnitin hydroklorid, HEPES, dimetylsulfoksid (DMSO) palmitinsyre (PA), oljesyre (OA), 22-S-hydroksykolesterol (22-S-HC) og 22-R-hydroksykolesterol (22-R-HC) ble kjøpt fra Sigma Aldrich Inc., (St. Louis, MO, USA). T0901317 ble kjøpt fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ble kjøpt fra PAA Laboratories GmbH, Pasing. [1-¹⁴C] acetic acid (55mCi/mmol) ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, USA). Insulin Actrapid® er fra Novo Nordisk (Bangsværd, Danmark). 96-brønners Corning®Cell-Bind® Surface, 75 cm³ Corning®Flask ble kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). 96-brønners Isoplate® ble kjøpt fra Wallac OY (Turku, Finland). Multiscreen®HTS ble kjøpt fra Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Bio-rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ble kjøpt fra Bio-Rad Laboratories Inc. (København, Danmark). [1-¹⁴C] palmitinsyre (PA) (53 mCi/ mmol), [1-¹⁴C] oljesyre (OA) (54.6 mCi/mmol), 96-brønners UniFilter®-96 GF/B®, TopSeal®-A klebende film og scintillasjonsvæsken OptiPhase Supermix® ble kjøpt fra PerkinElmer Life and Analytical Science (Boston, MA, USA). 96-brønners proteinplater ble kjøpt fra Nunc ® (Danmark). MicroAmp® 8-Tube Strip 0.2ml og MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate ble kjøpt fra Applied Biosystems (Singapore). Optical Adhesive covers ble kjøpt fra Applied Biosystems (Foster city, CA, USA). RNA Isolation Kit ble kjøpt fra Agilent Technologies Inc. (Wilmington, DE, USA). Power SYBR®Green PCR Master Mix ble kjøpt fra Applied Biosystems Warrington, UK). Taq Man® Reverse Transcription Reagents ble kjøpt fra Applied

Biosystems (New Jersey, USA). Primere ble kjøpt fra Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA).

Andre kjemikalier og reagenser som ble brukt var av analytisk kvalitet.

2.2 Metoder

2.2.1 Donorkarakteristika

Muskelceller ble isolert fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra 8 friske frivillige forsøkpå personer (tabell 2.1)

Tabell 2.1 Donorkarakteristika

Donor	Kjønn	Alder (år)	Fastende blodsukker (mmol/l)	BMI (kg/ m ²)
LD 15	K	55	6.9	29.1
LD 17	K	56	5.6	23.2
LD 18	K	52	5.2	22.2
LD 21	K	68	5.2	29.7
LD 25	K	60	7.5	Ukjent
LD 30	M	36	5.0	26.2
LD 36	K	41	4.7	20.3
LD 37	K	35	4.7	20.7
Gj.snitt ± SD		50.38 ± 11.89	5.6 ± 1.04	24.5 ± 3.88

LD: levende donor, BMI: body mass index, SD: standardavvik

2.2.2 Celledyrking

Cellekulturer ble etablert fra satellittceller fra en cellebank. Muskelbiopsier fra *Musculus obliquus internus abdominis* ble tatt under lokal bedøvelse, muskelcellene ble isolert, trypsinert og splittet og fryst ned i nitrogentank (- 196°C). Metoden er basert på arbeidene til Michael Gaster et al [39, 41].

Ved forsøk ble det tatt opp 1-2 ampuller med celler fra nitrogentanken og cellene ble tint raskt på vannbad ved 37°C. Innholdet ble overført til sentrifugerør og 5 ml utsåingsmedium (se vedlegg M1) ble tilsatt dråpevis. Det ble blandet forsiktig. Røret ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatant ble sugd av slik at toksisk, kuldebeskyttende DMSO ble fjernet. Cellepelleten ble resuspendert i M1 (først 1 ml, så telling av celler, deretter passe volum etter hva det trengtes til utsåing) og deretter sådd ut på 96 brønners Cell-Bind®Surface brett (100µl/brønn) eller 75 cm³ Corning Flasks® (10 ml/flaske).

Brettene er ferdig coated fra leverandør, mens flaskene må coats på forhånd. Dette gjøres ved å tilsette ECM fortynnet i DMEM m/ GLUTAMAX-I til flaskene. 0.5 ml ECM fortynnet i DMEM m/GLUTAMAX-I (i forholdet 5:75) ble tatt ut av fryser og tint i romtemperatur og deretter fortynnet ytterligere med 2 ml DMEM m/GLUTAMAX-I. 6 Corning Flasks® på 75 cm³ ble coatet med denne løsningen, overskudd sugd av og tørket i romtemperatur, før utsåing av celler. Cellene ble satt i inkubator ved 37°C og 5% CO₂.

Etter 24 timer ble det byttet til proliferasjonsmedium (se vedlegg M2). Cellene ble dyrket til de var 70-80% konfluente, med skift av medium hver 3. dag. Ved konfluens ble det byttet til differensieringsmedium (se vedlegg M3). På dag 4 og 6 av differensieringen, ble 8 brønner tilsatt 0.1% DMSO eller 1 flaske tilsatt 0.05% DMSO (kontroll), 1 µmol/l T0901317, 1 µmol/l T0901317 + 10 µmol/l 22(S)-HC (dette ble endret til 5 µmol/l 22(S)-HC underveis i oppgaven) eller 10 µmol/l 22(R)-HC (kun brett) , totalt 4 dager. Differensieringsmediet inneholder 5.5 mM glukose. Det ble også benyttet medium som var tilsatt ekstra glukose til total konsentrasjon 20 mM (HG) i disse 4 dagene.

2.2.3 Oksidasjon og cellassosiasjon av fettsyrer

Akkumulering av fettsyrer og påfølgende oksidasjon i celler, er et mål på den metabolske aktiviteten til cellene. Metoden er tidligere beskrevet av Wensaas et al [42].

Cellene ble dyrket på 96-brønners Cell-bind®Surface-brett som beskrevet ovenfor. På dag 8 av differensieringen ble det tilsatt 50 µl av ¹⁴C merket palmitinsyre- (C16:0) eller oljesyre- (C18:1) medium (se vedlegg M4) per brønn. En 96-brønners filterplate (Unifilter®-96 GF/B®) ble fuktet med 20 µl 1M NaOH for å aktiveres til å fange CO₂. Celleplaten, en silikonplate og filterplaten danner en ”sandwich” som settes i et apparat av metall. Dette ble plassert i en inkubator ved 37°C i 4 timer. Etter 4 timer ble utstyret tatt ut av inkubatoren.

Det ble overført 30 µl medium etter inkubasjonen til en 96-brønners plate for måling av syreløselige metabolitter (β-oksidasjonsprodukter) (se 2.2.4).

Filterplaten ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix® per brønn og forseglet med gjennomsiktig plastfilm (TopSeal®-A). CO₂ som ble dannet ved cellulær respirasjon ble fanget i filtrene. Radioaktiviteten ble målt etter 2 dager ved hjelp av Wallac 1450 MicroBeta® Plus.

Cellebrettet ble vasket med 2 x 150 µl PBS-buffer (se vedlegg B1) for å fjerne overskudd av radiomerking, deretter ble det tilsatt 200 µl 0.1 M NaOH. 50 µl lysat fra hver brønn ble overført til en 96-brønners mikrotiter plate for måling av proteiner (se 2.2.5). 50 µl lysat fra hver brønn ble overført til en 96-brønners Isoplate® og hver brønn ble tilsatt 100 µl Optiphase Supermix®. Brettet ble forseglet med gjennomsiktig plastfilm (TopSeal®-A) og celleassosierte radiomerkede fettsyrer (CA) ble målt etter 2 timer ved hjelp av Wallac 1450 MicroBeta® Plus.

2.2.4 Måling av syreløselige metabolitter (ASM)

β-oksidasjonsprodukter (= syreløselig metabolitter) fra radioaktiv fettsyre (PA eller OA) vil gjenfinnes i forsøksmediet etter endt inkubasjon.

30 µl medium ble overført til en 96-brønners plate og tilsatt 10 µl 6% BSA og 100 µl 1M perklorsyre. Platen ble sentrifugert i en platesentrifuge ved 5000 rpm og 4°C i 10 minutter. Deretter ble det overført 30 µl av supernatanten til en 96-brønners telleplate og 100µl Optiphase Supermix® ble tilsatt per brønn. Brettet ble forseglet med

gjennomsiktig plastfilm (TopSeal®-A). Radioaktiviteten ble målt ved hjelp av Wallac 1450 MicroBeta® Plus.

2.2.5 Måling av proteiner

Kvantifisering av proteinene i prøvene er basert på Bradford-metoden. Dette er en spektrofotometrisk metode, der binding av fargen Coomassie Brilljant blå til ukjent konsentrasjon proteiner, sammenliknes med bindingen av fargen til kjente konsentrasjoner av standardproteiner (vanligvis BSA) [43].

Proteinstandarder ble laget av Bovint serum albumin fortynnet med 0.05 M NaOH i konsentrasjonene 0 µg/ml (kun NaOH), 10, 20, 40 og 80 µg/ml. 50 µl cellelysat ble avsatt per brønn i en 96-brønners mikrotiterplate. 50 µl av hver proteinstandard ble hatt i 2 parallelle brønner på samme brettet som cellelysatene. Alle brønnene ble deretter tilsatt 200 µl proteinfargereagens (Bio-Rad® + destillert vann; 1:4).

Mengden protein ble målt ved hjelp av Wallac Victor® mikroplateleser fra Perkin Elmer. Den avleser absorbansen ved 595 nm og beregner konsentrasjonen i prøvene ut i fra standardkurven.

2.2.6 Lipidfiltrasjon

Fettsyrer kan akkumuleres som lipider i cellene. Ved lipidfiltrasjon binder akkumulerte lipider seg til en hydrofob membran og radioaktiviteten kvantifiseres.

Cellene ble dyrket på 96-brønners Cell-bind®Surface-brett som beskrevet ovenfor (2.2.2). På dag 8 av differensieringen ble det tilsatt i hver brønn 50 µl av radiomerket medium av acetat, palmitinsyre eller oljesyre (se vedlegg M5). Brettene ble satt inn i inkubator ved 37°C og 5% CO₂ i 4 timer. Cellebrettet ble vasket med 2 x 150 µl PBS-buffer (se vedlegg B1). Det ble tilsatt 200 µl 0.2M NaOH. Brettene ble dekt med plastfilm og satt i -20°C fryser i 1-2 dager.

Cellebrettene ble tatt ut av fryseren og tint i inkubator ved 37°C i 1-2 timer.

Multiscreen®HTS filterplater ble fuktet og aktivert med 50 µl 70% etanol i hver brønn og stod på benken i 30 sekunder. Etanolen ble filtrert gjennom filteret ved hjelp

av Millipor vakuumbastasjon og deretter vasket med 2 x 200 µl destillert vann. Overflødig vann ble fjernet før prøvene ble satt på. 50 µl av cellelysatet ble tilsatt i hver brønn og filtrert. Det ble deretter vasket med 6 x 100 µl destillert vann. Overflødig vann ble fjernet og plastcoveret på undersiden ble erstattet med en gjennomsiktig film (Top Seal®-A). Det ble tilsatt 100 µl Optiphas Supermix® i hver brønn og brettet ble forseglet med samme film som på undersiden. Radioaktiviteten til lipidene ble målt samme dag ved hjelp av Wallac 1450 MicroBeta® Plus. 50 µl av cellelysatet ble overført til en 96-brønners mikrotiterplate og det ble foretatt proteinmåling som beskrevet tidligere (2.2.5)

2.2.7 RNA-isolering og analyse av genekspressjon med Real Time Poly Chain Reaction (RT-PCR)

LXR-ligander kan påvirke ekspresjonen av gener involvert i lipid- og kolesterolmetabolismen. Vi ønsket å undersøke hvordan ekspresjonen av ABCA1 og SCD-1 ble endret ved tilsetning av ulike LXR-ligander.

Utsåing av celler og dyrking av dem ble gjort på 75 cm³ flasker som beskrevet i 2.2.2, men det ble ikke benyttet 22(R)-hydroksykolesterol. På dag 8 av differensieringen ble cellene isolert. Mediet ble sugd av og cellene vasket med 3 x 4 ml HBSS og deretter sugd av. 4 ml trypsin/ EDTA ble tilsatt og flasken ble inkubert ved 37°C i ca 2-3 minutter til cellene var løsnet. Cellene ble overført til et 50 ml sentrifugerør. 2 x 5 ml proliferasjonsmedium (se vedlegg M2) ble tilsatt flasken for å få med alle cellene og overført til sentrifugerøret. Det ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatant ble fjernet og cellepelletten ble vasket med 2 ml HBSS og sentrifugert på nytt. Supernatant ble fjernet og 600 µl Agilent Technologies lysisbuffer® ble tilsatt hvert rør. Rørene ble fryst ned ved -70°C.

Isolering av totalt RNA

Sentrifugerørene ble tatt ut fra fryseren og tint. Isolering av totalt RNA ble gjort i henhold til protokoll fra Agilent Technologies®; "Agilent Total RNA Isolation Protocol for Cultured cells". Det ble benyttet et sett (kit) med minikolonner, vaskeløsninger og nukleasefritt vann designet til formålet. I korte trekk består

prosedyren av prefiltrering og sentrifugering i mikrosentrifuge (Universal 32 R Hettich Zentrifugen), tilsetning av 70 % etanol (fremmer selektiv binding av RNA til membranen i kolonnen), så flere trinn med vasking og filtrering gjennom minikolonner, etterfulgt av sentrifugering fra 30 sekunder og opptil 3 minutter. RNA ble til slutt eluert av kolonnen ved hjelp av nukleasefritt vann. I alt ble det isolert totalt RNA fra 18 ulike celleprøver.

Det ble tatt ut 2 µl fra hvert av eluatene og blandet med 68 µl nukleasefritt vann for kvantifisering av RNA. Ved å måle absorbans ved 260 nm i et spektrofotometer ble konsentrasjonen beregnet ut fra formelen: $\frac{260 \text{ nm} \times 40 \times 35}{1000}$. Konsentrasjonene ble brukt til å beregne hvor mange µl RNA det skal tilsettes reaksjonsblandingen til cDNA syntese (revers transkripsjon).

cDNA syntese

19 mini-ependorfrør (MicroAmp®) ble merket (18 prøver og en negativ kontroll uten revers transkriptase) og tilsatt 20 µl av reaksjonsblandingen for komplementær DNA (cDNA) syntese (se vedlegg M6). Eppendorfrørene ble satt inn i Thermal Cycler 9600 Perkin Elmer®, 25°C i 10 minutter (heksamer/ templat priming), 37°C i 1 time (RT) og 99°C i 5 minutter (RT inaktivering), så 4°C til rørene ble tatt ut neste dag.

Real time PCR

Det ble laget en standardkurve-rekke ved å ta ut 2 µl fra hvert av de 18 prøverørene med cDNA (ikke negativ kontroll) i ett eppendorfrør, deretter fortynnet (1:5) med 144 µl DEPC-dH₂O (= 1000 standard). 90 µl fra dette røret ble overført til et nytt eppendorfrør og fortynnet med 90 µl DEPC-dH₂O (= 500 standard). Dette ble gjentatt til 250, 125, 62.5 og 31.25 standarder. cDNA prøvene ble fortynnet til enten 1:10 (housekeeping gener) eller 1:5 (målgener) med DEPC-dH₂O.

I en 96-brønners plate (MicroAmp®) ble det i hver brønn tilsatt 22.5 µl RT-PCR reaksjonsblanding (se vedlegg M7) og 2.5 µl av fortynnet cDNA eller standarder. På toppen av platen ble det klistret en gjennomsiktig plastfilm (Optical Adhesive

Covers) . Platen ble satt inn i ABI PRISM® 7000 Detection System som kjører PCR i 40 sykluser (95°C i 15 sekunder etterfulgt av 60°C i 60 sekunder).

Tabell 2.2 Primere brukt ved Real Time PCR

Gener	Acc.no.	Primere
GAPDH	NM_002046	Forward: TGCACCACCAACTGCTTAGC Reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGAG
36B4	M17885	Forward: CCATTCTATCATCAACGGGTACAA Reverse: AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
SCD-1	AB032261	Forward: CTCCCCTGCCCACTGATG Reverse: GAGCGCTTGGCTTCTCATG
ABCA1	AF165281	Forward: GAACAGCAGTTGGATGGCTTAGA Reverse: ACAGAACCATTACTGGACTGGACAT

ACC.no: Gen Bank accession number

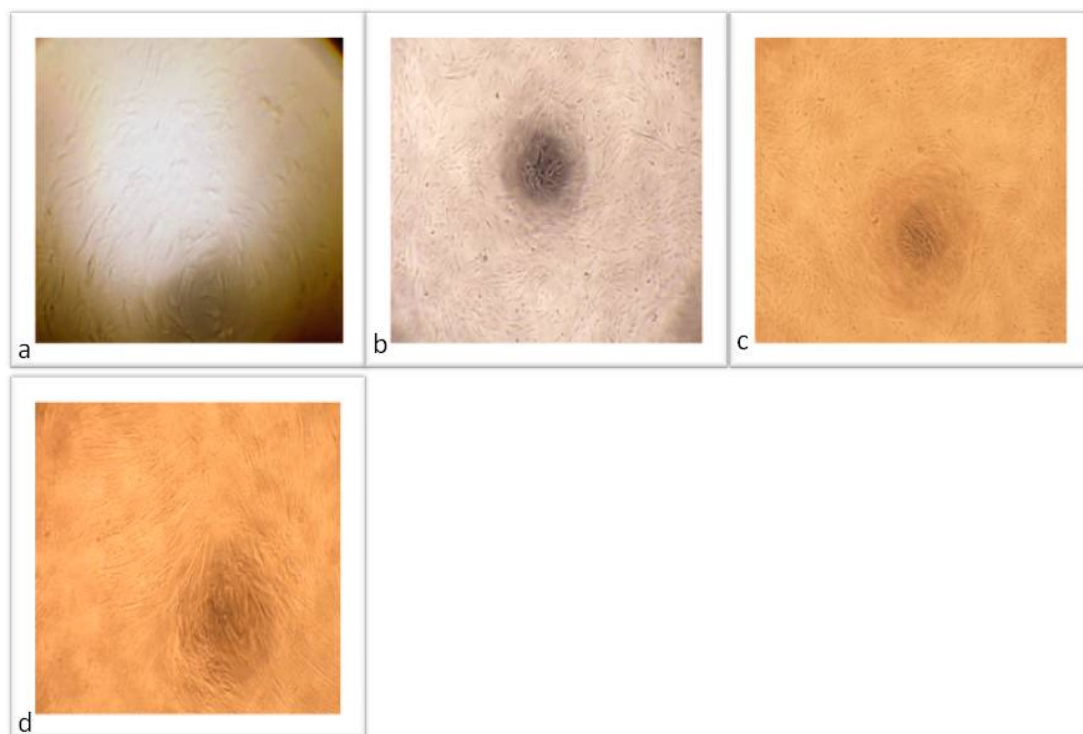
2.3 Statistisk analyse

Alle dataene er presentert som gjennomsnittverdier \pm SEM, eller omregnet til % av kontroll \pm SEM eller omregnet til % av NG \pm SEM. Hvert forsøk ble utført 3-5 ganger, med 8 paralleller for hver behandling (gjelder forsøk på 96-brønners brett). De ulike forsøkene ble gjort med celler fra ulike donorer (bortsett fra 2 forsøk med lipidfiltrasjonsmetoden). Statistisk sammenlikning mellom de ulike behandlingene og kontrollen, samt statistisk sammenlikning mellom behandling av T0901317 + 22(S)-HC og T0901317, ble gjort med tosidig, toutvalgs t-test for to ulike populasjoner ($H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, $H_a: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$). Programmet som ble brukt heter Minitab®, versjon 15. I forkant av t-testen ble det sjekket om dataene var normalfordelte. $p < 0.05$ ble ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

3.1 Utsåing av celler

Bildene nedenfor viser hvordan celler fra donor LD 15 utviklet seg i et 96-brønners Cell-bind®Surface -brett. Disse cellene stod i inkubator i 5 dager før de var konfluente nok til å kunne differensieres. I nesten alle forsøkene ble differensieringsmediet (se vedlegg M3) tilsatt dag 4 etter utsåing. På figur 1d vises det hvordan cellene slo seg sammen under differensieringen og dannet flerkjernede myotuber.



Figur 3.1: Dyrking av celler fra donor LD 15 på 96-brønners Brett

a: dagen etter utsåing, før tilsetning av proliferasjonsmedium (10 X forstørrelse),

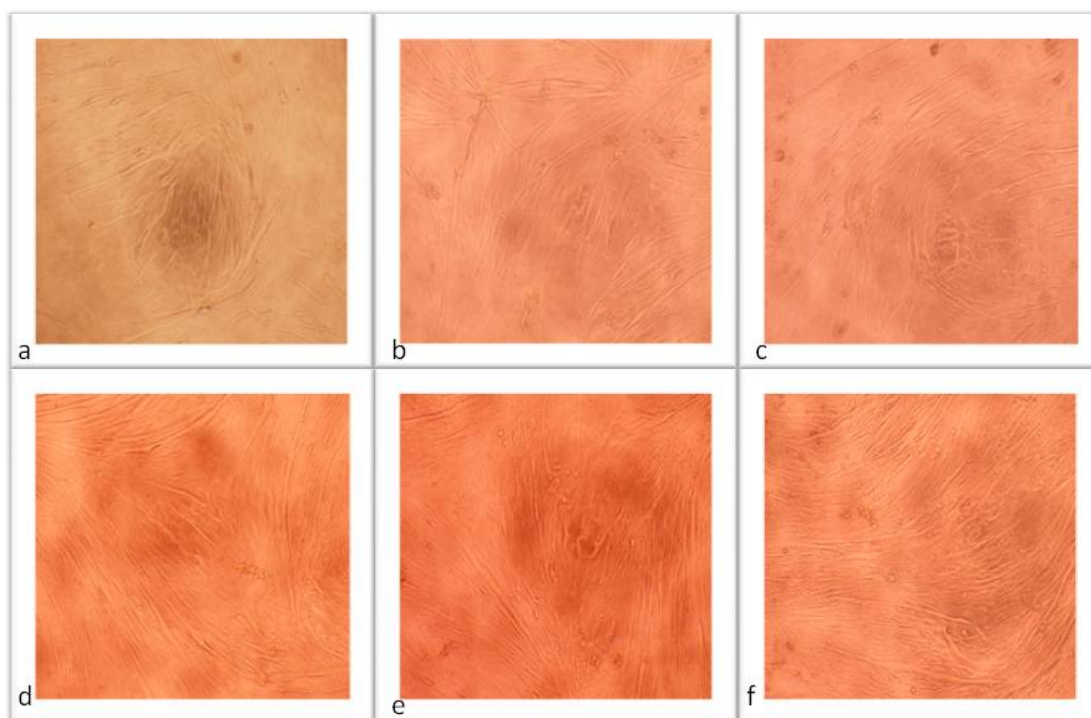
b: dag 3 etter utsåing (4 X forstørrelse),

c: dag 4 etter utsåing (4 X forstørrelse),

d: dag 7 etter utsåing, 3 dager etter tilsetning av differensieringsmedium (4 X forstørrelse).

Bildene ble tatt 1-2 dager etter tilsetningene.

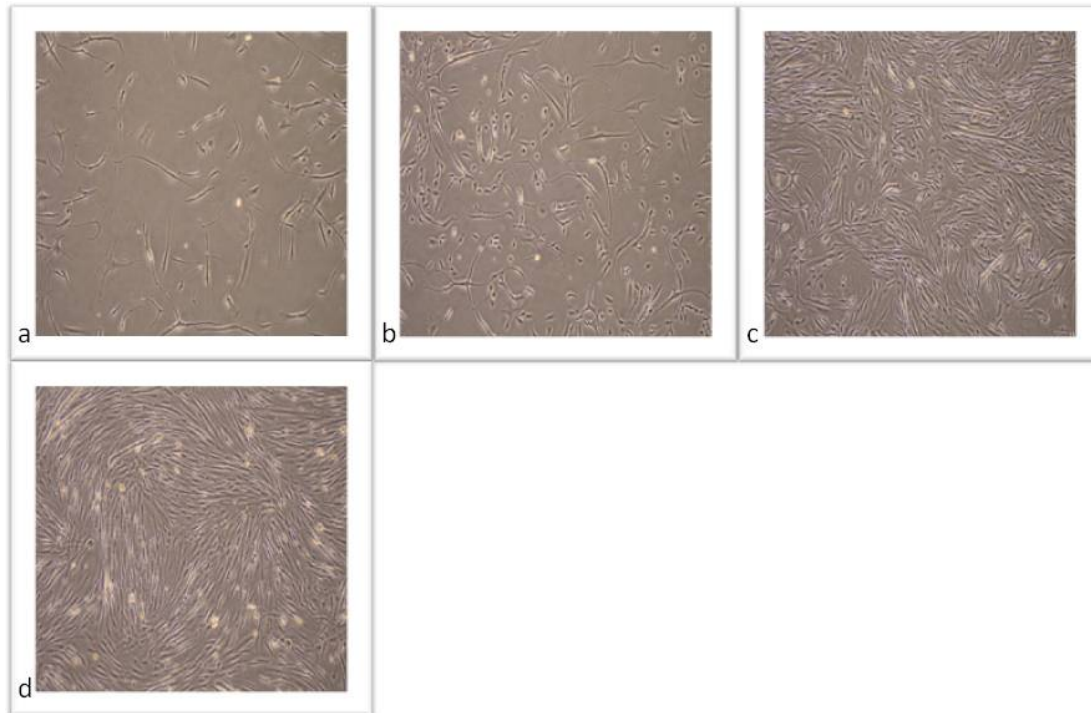
LXR-ligander ble tilsatt i differensieringsmediet fjerde og sjette dag av differensieringen. Bildene på figur 3.2 viser tilsetning av 1 μM T0901317 med 5.5 mM glukose (a og b) sammenlignet med kontrollen (c). Bildene d-f viser cellene etter tilsetning av henholdsvis 1 μM T0901317 (T), 5 μM 22(S)-HC (S) og kombinasjonen av T+S, her med 20 mM glukose. Bildene viser ingen morfologiske forskjeller på cellene under forsøket etter ulike tilsetninger.



Figur 3.2: Tilsetning av LXR-ligander til donor LD 15 på 96-brønners brett (4 X forstørrelse)

a: dag 9 etter utsåing, 2 dager etter tilsetning av T (5.5 mM glukose), b: dag 11, 4 dager etter tilsetning av T (5.5 mM glukose), c: dag 11, Kontroll (5.5 mM glukose), d: dag 11, 4 dager etter tilsetning av T (20 mM glukose), e: dag 11, 4 dager etter tilsetning av S (20 mM glukose), f: dag 11, 4 dager etter tilsetning av T+S (20mM glukose). Bildene ble tatt 1-2 dager etter tilsetningene.

Celler som ble sådd ut på 75 cm³ flasker trengte lengre tid til å oppnå 70-80% konfluens enn de som ble sådd ut på 96-brønners brett. Det ble skiftet proliferasjonsmedium tre ganger før de kunne differensieres. Bildene på figur 3.3 viser utviklingen av celler fra donor 17 sådd ut på flasker (tatt 1-2 dager etter tilsetningene).



Figur 3.3: Dyrking av celler i 75 cm³ flasker fra donor LD 17 (4 X forstørrelse)

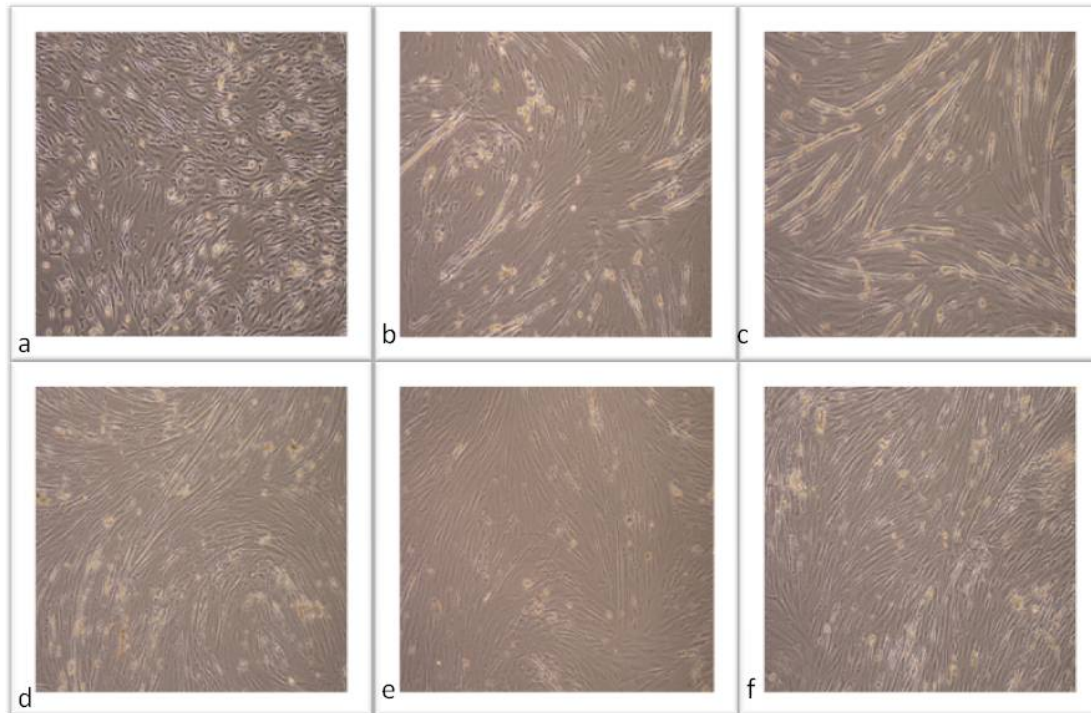
a: dag 3 etter utsåing.

b: dag 5 etter utsåing.

c: dag 7 etter utsåing.

d: dag 10 etter utsåing. 3 dager etter tilsetning av differensieringsmedium.

Figur 3.4 viser bilder tatt av cellene fra donor LD 17 etter tilsetning av ulike LXR-ligander. Cellene i a-c ble tilsatt henholdsvis 0.1% DMSO (kontroll), 5 μ M 22(S)-HC (S), eller 1 μ M T0901317 (T) (5.5 mM glukose), mens cellene i d-f fikk samme behandling, men med 20 mM glukose. Bildene viser ingen tydelige forskjeller på cellene under de ulike behandlingene.



Figur 3.4: Tilsetning av LXR-ligander til donor LD 17 (4 X forstørrelse)

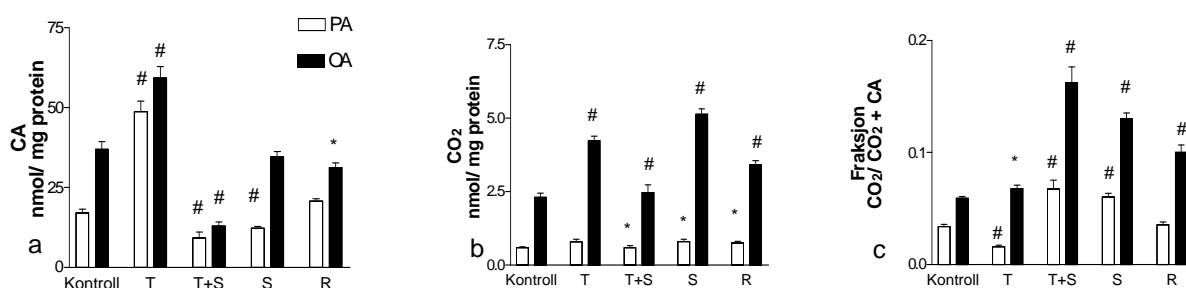
a: dag 14 etter utsåing. Kontroll (5.5 mM glukose), b: dag 14, 4 dager etter tilsetning av S (5.5 mM glukose), c: dag 14, 4 dager etter tilsetning av T (5.5 mM glukose), d: dag 14 etter utsåing. Kontroll (20 mM glukose), e: dag 14, 4 dager etter tilsetning av S (20 mM glukose), f: dag 14, 4 dager etter tilsetning av T (20 mM glukose)

3.2 Oksidasjon og cellassosiasjon av fettsyrer

Et av målene for oppgaven var å undersøke om LXR-ligander kan påvirke opptak og omsetning av fettsyrene palmitinsyre (PA) eller oljesyre (OA) i muskelceller.

Differensierte myotuber ble behandlet i 4 dager med ulike LXR-ligander, før de ble inkubert i 4 timer med medium tilsatt enten radioaktiv PA eller OA (se vedlegg M4).

Det ble målt radioaktivitet av celleassosierte fettsyrer og oksidasjon av radioaktive fettsyrer som beskrevet i 2.2.3. Oksidasjonen ble kvantifisert ut i fra hvor mye CO₂ som ble fanget i filterplaten under inkuberingen. Figur 3.5 viser resultater fra ett enkelt forsøk med normoglykemi (5.5 mM glukose).



Figur 3.5: Oksidasjon og celleassosiasjon, samt fraksjonen av palmitinsyre og oljesyre for ett enkelt forsøk med normoglykemi (5.5 mM glukose)

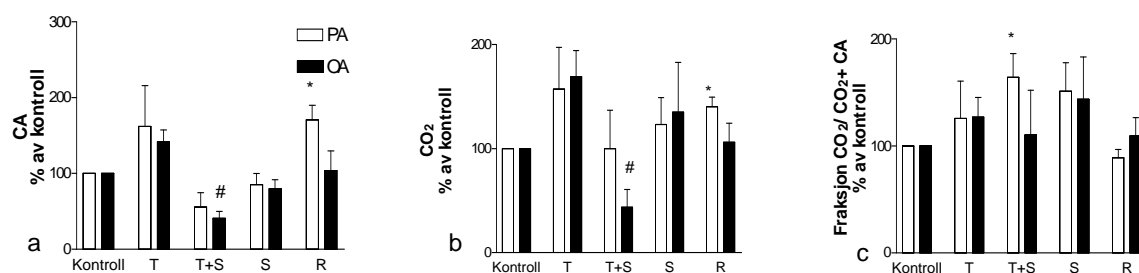
Celleassosiasjon (a), oksidasjon (b), samt fraksjon [$\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$] (c), av palmitinsyre (PA) og oljesyre (OA) etter behandling med LXR-ligander. Differensierte myotuber ble behandlet i 4 dager med henholdsvis 0,1 % DMSO (kontroll), 1 μM T0901317 (T), 1 μM T0901317 + 10 μM 22(S)-HC (T+S), 10 μM 22(S)-HC eller 10 μM 22(R)-HC (R), før de ble inkubert i 4 timer med enten PA- eller OA-medium (1 $\mu\text{Ci/ml}$) (se vedlegg M4). Data vises som gjennomsnitt \pm SEM (n=8). Statistisk signifikans, T, S og R versus kontroll, T+S versus T. * ($p < 0.05$), # ($p < 0.01$).

Tilsetning av 1 μM T0901317 ga signifikant økt mengde CA av både radioaktiv PA og OA, sammenliknet med kontrollen (0.1% DMSO) ($p \leq 0.01$). Når 10 μM 22(S)-HC ble tilsatt sammen med T0901317, ble effekten av T0901317 redusert ($p \leq 0.01$). 22(S)-HC gitt alene ga ingen økning i opptak av PA eller OA,

sammenliknet med kontrollen. Tilsetning av 10 μM 22(R)-HC kan her tyde på et visst økt opptak av PA ($p = 0.02$), men den har ingen effekt på OA, sammenliknet med kontrollen (figur 3.5.a).

Oksidasjonen av fettsyrene er vist i figur 3.5.b. De tre LXR-ligandene T0901317 (1 μM), 22(S)-HC (10 μM) og 22(R)-HC (10 μM) ga en bitte liten økning i oksidasjonen av PA sammenliknet med kontrollen (kun 22(S)-HC og 22(R)-HC var signifikante ($p \leq 0.05$)). Oksidasjonen av OA var noe høyere enn PA (alle tre ligandene ga signifikant økning i forhold til kontrollen ($p \leq 0.01$)). Når 22(S)-HC ble gitt sammen med T0901317, ble effekten av T0901317 redusert både for PA og OA ($p < 0.05$ for PA, $p < 0.01$ for OA, sammenliknet med T0901317) (figur 3.5.b).

Fraksjonen ($\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$) sier noe om hvordan forbruket av fettsyrene er i forhold til det som ble tatt opp i muskelcellene. Mengde CO_2 dannet, gjenspeiler oksidasjonen av fettsyrene (figur 3.5.c). Det ble også forsøkt å måle syreløselige metabolitter (ASM) i cellemediet fra β -oksidasjon av fettsyrene, men den metoden fikk vi ikke til (resultater ikke vist her). Absoluttverdiene for oksidasjonen av PA og OA var mye lavere enn celleassosiasjonen, og det ble derfor veldig lave tall for fraksjonen. Våre forsøk kan tyde på at celler som akkumulerer OA, oksiderer en større andel av det cellene tar opp enn ved PA, men tallene er som sagt veldig små.



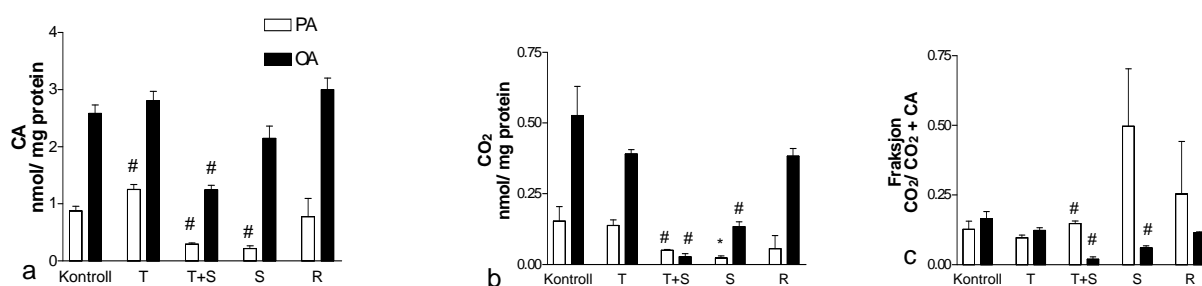
Figur 3.6: Celleassosiasjon og oksidasjon, samt fraksjon av palmitinsyre og oljesyre for alle forsøk med normoglykemi (5.5 mM glukose).

Celleassosiasjon (a), oksidasjon (b), samt fraksjon [$\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$] (c) av palmitinsyre (PA) eller oljesyre (OA) etter behandling med LXR-ligander, slik som beskrevet i figur 3.5. Data vises som % av kontroll \pm SEM ($n=5$). Statistisk signifikans, T, S og R versus kontroll, T+S versus T. * ($p < 0.05$), # ($p < 0.01$).

Figur 3.6 viser gjennomsnittet av fem forsøk med NG (5.5 mM glukose) på 96-brønners brett, gitt i % av kontrollen. Tilsetning av 1 μM T0901317 tenderte også her til økt CA av både PA og OA i cellene sammenliknet med kontrollen (0.1%DMSO) (ikke signifikant). Effekten av T0901317 ble motvirket når 5-10 μM 22(S)-HC ble tilsatt (signifikant for OA, men ikke PA). 22(S)-HC gitt alene ga ingen effekt på CA, mens tilsetning av 10 μM 22(R)-HC ga signifikant økt CA av PA ($p \leq 0.05$), men ikke OA (figur 3.6.a). Gjennomsnittet av forsøkene gir samme bilde som det ene forsøket vist i figur 3.5, men effektene er mindre tydelige.

1 μM T0901317 ga økt oksidasjon av PA, sammenliknet med kontrollen, mens 5-10 μM 22(S)-HC og 10 μM 22(R)-HC ga noe mindre økning av oksidasjonen av PA (kun 22(R)-HC var signifikant ($p \leq 0.05$)). 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317, reduserte dens effekt på oksidasjonen av PA (ikke signifikant). T0901317 og 22(S)-HC ga økt oksidasjon av OA sammenliknet med både kontroll og oksidasjon av PA. 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317 reduserte dens effekt på oksidasjon av OA ($p \leq 0.01$ sammenliknet med T0901317). Tilsetning av 22(R)-HC ga bare en minimal økt oksidasjon av OA sammenliknet med kontrollen (ikke signifikant) (figur 3.6.b).

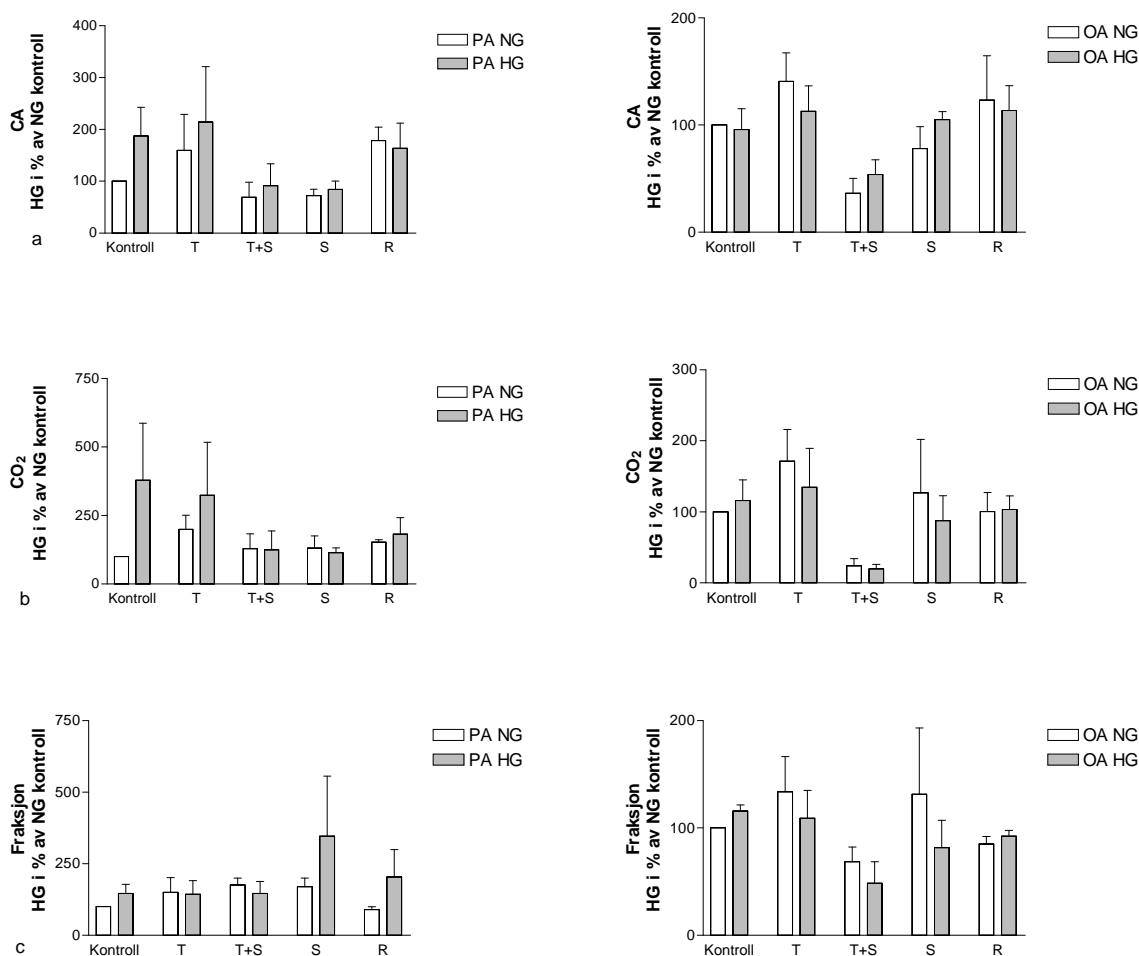
Tilsvarende forsøk ble gjort med hyperglykemi (20 mM glukose). Differensierte myotuber ble også her behandlet i 4 dager med ulike LXR-ligander, før de den åttende dagen av differensieringen, ble inkubert i 4 timer med enten radioaktivt PA- eller OA- medium (se vedlegg M4).



Figur 3.7: Celleassosiasjon, oksidasjon samt fraksjon, av palmitinsyre og oljesyre for ett enkelt forsøk med hyperglykemi (20 mM glukose).

Celleassosiasjon (a), oksidasjon (b), samt fraksjon [$\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$] (c) av palmitinsyre (PA) eller oljesyre (OA) etter behandling med LXR-ligander, slik som beskrevet i figur 3.5. Data vises som gjennomsnitt \pm SEM (n=8). Statistisk signifikans, T, S og R versus kontroll, T+S versus T. * ($p < 0.05$), # ($p < 0,01$).

Figur 3.7 viser resultatene fra ett enkelt forsøk med hyperglykemi. Tilsetning av 1 μM T0901317 ga en liten, men signifikant økning av celleassosiert PA sammenliknet med kontrollen ($p \leq 0.01$), mens de andre LXR-ligandene ikke viste tilsvarende økning. 5-10 μM 22(S)-HC gitt sammen med T09091317 reduserte dens effekt ($p \leq 0.01$ sammenliknet med T0901317), slik som vi så ved normoglykemi. For OA kan vi se en liten effekt på CA når 1 μM T0901317 og 10 μM 22(R)-HC ble tilsatt (sammenliknet med kontrollen) (ikke signifikant), mens 22(S)-HC ikke ga den økningen. 22(S)-HC gitt sammen med T0901317, reduserte også dens effekt på celleassosiert OA ($p \leq 0.01$ sammenliknet med T0901317) (figur 3.7.a). Ingen av LXR-ligandene viste her noen effekt på oksidasjonen av verken PA eller OA, sammenliknet med kontrollen (figur 3.7.b).



Figur 3.8: Celleassosiasjon og oksidasjon, samt fraksjon av palmitinsyre og oljesyre for alle forsøk med hyperglykemi (20 mM glukose).

Celleassosiasjon (a), oksidasjon (b), samt fraksjon [$\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$] (c) av palmitinsyre (PA) eller oljesyre (OA) etter behandling med LXR-ligander, slik som beskrevet i figur 3.5. NG; normoglykemi. HG; hyperglykemi. Resultatene er gitt som % av NG kontroll \pm SEM ($n = 3$). Ingen av resultatene var statistisk signifikante ($p > 0.05$).

Gjennomsnitt av tre forsøk med både NG og HG vises i figur 3.8. Her er PA og OA vist hver for seg, og HG er vist i prosent av NG. T0901317 ga en liten økning i celleassosiert PA sammenliknet med kontrollen, økningen er mindre for HG enn NG. 22(S)-HC gitt alene påvirket ikke celleassosiert PA, men reduserer effekten av T0901317. 22(R)-HC ga ikke utslag på CA av PA, sammenliknet med kontrollen. For OA har både T0901317, 22(S)-HC og 22(R)-HC gitt en liten økning av celleassosiert

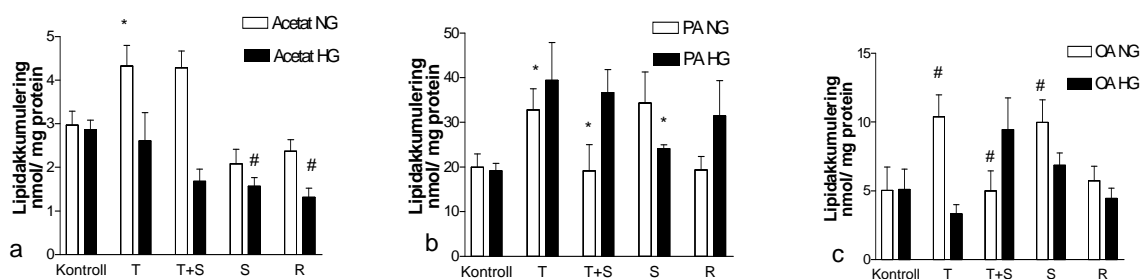
OA sammenliknet med kontrollen. Kombinasjonen T+S viser samme mønsteret som sett tidligere (figur 3.8.a).

Oksidasjonen av PA ble ikke påvirket av LXR-ligandene ved HG. For OA kan det sees en liten økning i oksidasjonen når T0901317 ble tilsatt, sammenliknet med kontrollen. 22(S)-HC reduserte også her effekten av T0901317 på oksidasjonen av OA (figur 3.8.b). Ingen av resultatene for HG vist i figur 3.8 var signifikante, verken i forhold til kontroll NG eller kontroll HG.

3.3 Lipidfiltrasjon

Fettsyrer som tas opp i muskelceller kan lagres som triglyserider, kolesterolestere, fosfolipider eller som frie fettsyrer [44]. Ved lipidfiltrasjon binder lipidene seg til en hydrofob membran og det måles mengde radioaktivitet til akkumulerte lipider.

Differensierte myotuber ble behandlet i 4 dager med ulike LXR-ligander, før de ble inkubert i 4 timer med medium tilsatt radioaktiv acetat, PA eller OA (se vedlegg M5). Figur 3.7 viser resultatene for et enkelt forsøk med både NG (5.5 mM glukose) og HG (20 mM glukose).



Figur 3.9: Lipidakkumulering fra acetat, palmitinsyre eller oljesyre for ett enkelt forsøk

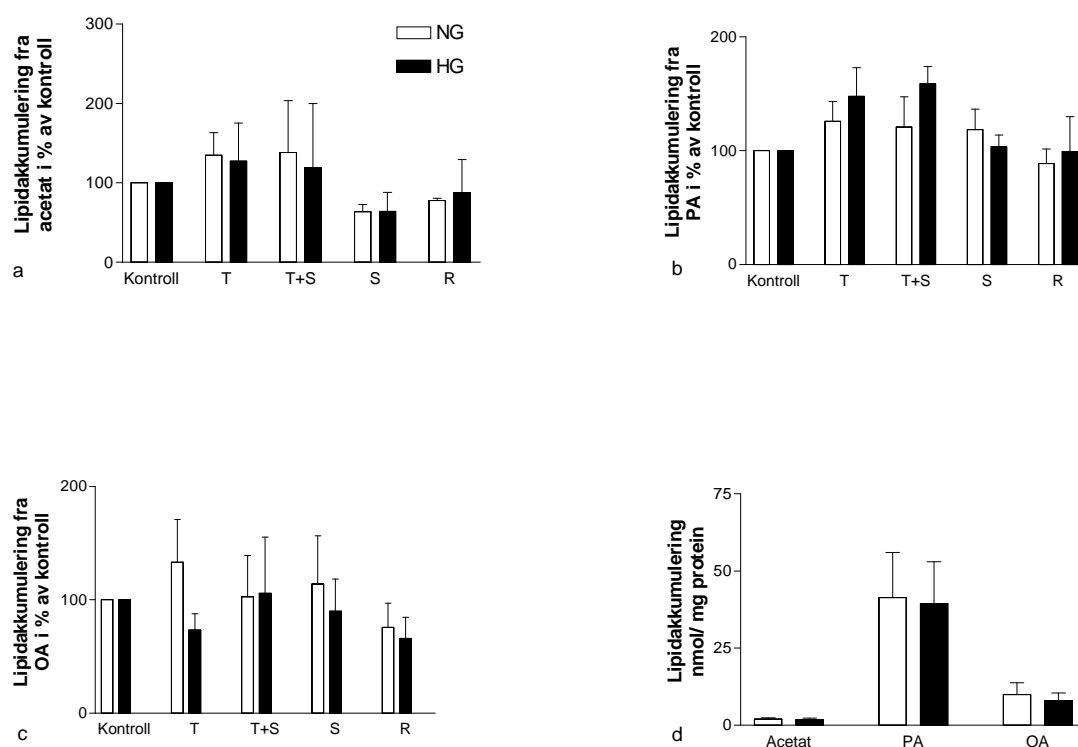
Syntese av cellulære lipider fra acetat (a) eller forestring av palmitinsyre (PA) (b) eller oljesyre (OA) (c).

Differensierte myotuber ble behandlet i 4 dager med henholdsvis 0,1 % DMSO (kontroll), 1 μ M T0901317 (T), 1 μ M T0901317 + 5 μ M 22(S)-HC (T+S), 10 μ M 22(S)-HC (S) eller 10 μ M 22(R)-HC (R), før de ble inkubert i 4 timer med enten acetat-, PA- eller OA-medium (se vedlegg M5). Mediene var enten normoglykemiske (NG; 5.5 mM glukose) eller hyperglykemiske (HG; 20 mM glukose). Data vises som gjennomsnitt \pm SEM (n=8). Statistisk signifikans, T, S og R versus kontroll, T+S versus T. * ($p < 0.05$), # ($p < 0,01$).

Behandling med 1 μM T0901317 ga signifikant økt lipidakkumulering fra acetat ved NG, sammenliknet med kontrollen ($p \leq 0.05$). De andre LXR-ligandene viste ikke tilsvarende effekt. Tilsetning av 5 μM 22(S)-HC ga i dette forsøket ingen hemming av effekten til T0901317. Ved HG ga ingen av LXR-ligandene som ble benyttet økning av lipidakkumulering fra acetat sammenliknet med kontrollen (figur 3.9.a).

Tilsvarende behandling med 1 μM T0901317 og 5 μM 22(S)-HC ga økt lipidakkumulering av PA ved NG, sammenliknet med kontrollen (signifikant for T0901317, $p \leq 0.05$). 5 μM 22(S)-HC gitt samtidig med 1 μM T0901317 hemmet dens effekt på lipidakkumuleringen (signifikant for NG ($p \leq 0.05$), men ikke for HG). 10 μM 22(R)-HC ga ingen effekt på lipidakkumulering av PA ved NG. Ved HG ga alle LXR-ligandene en økt akkumulering av lipider fra PA, sammenliknet med kontrollen og NG. Også i dette forsøket ga 22(S)-HC en redusert effekt på T0901317 når de ble gitt samtidig (figur 3.9.b).

Behandling med alle LXR-ligandene ga økt lipidakkumulering av OA ved NG (signifikant for T0901317 og 22(S)-HC, ($p \leq 0.01$) (figur 3.9.c). Også her hemmet 5 μM 22(S)-HC effekten til 1 mM T0901317 når de ble gitt samtidig ($p \leq 0.01$ for NG, $p \leq 0.05$ for HG). Ved HG var det oksysterolene 22(S)-HC og 22(R)-HC som ga økt (men ikke signifikant) lipidakkumulering av OA, sammenliknet med kontrollen. 1 μM T0901317 ga ikke noen økning i lipidakkumuleringen av OA. Dette forsøket viste en økning av lipidakkumulering av OA når 1 μM T0901317 ble gitt samtidig med 5 μM 22(S)-HC, sammenliknet med kontrollen (ikke signifikant).



Figur 3.10: Lipidakkumulering fra acetat, PA eller OA for alle forsøkene

Syntese av cellulære lipider fra acetat (a) eller forestring av palmitinsyre (PA) (b) eller oljesyre (OA) (c). Figur d viser absoluttverdier for kontrollene under forsøkene (n=3-4). Behandlingen er den samme som beskrevet i figur 3.8. NG; normoglykemi. HG; hyperglykemi. Resultatene er gitt i % av kontrollen \pm SEM. Ingen av resultatene var signifikante ($p > 0.05$).

Figur 3.10 viser gjennomsnittet fra alle forsøkene med lipidfiltrasjon, både NG og HG. 1 μ M T0901317 tenderte til økt lipidakkumulering fra acetat for både NG og HG. 22(S)-HC og 22(R)-HC viste ingen økning av lipidakkumulering sett i forhold til kontrollen. Det kan ikke slås fast fra disse forsøkene om 22(S)-HC hadde en reduserende effekt på T0901317 når de ble gitt samtidig, til det er spredningen av resultatene for store (figur 3.10.a).

1 μ M T0901317 ga økt lipidakkumulering av PA, både ved NG og HG, sammenliknet med kontrollen. Også her er det vanskelig å si noe om hvordan T0901317 og 22(S)-HC gitt samtidig, påvirker lipidakkumuleringen til PA. 22(R)-HC

så ikke ut til å ha noen økning av lipidakkumulering for PA, verken ved NG eller HG (figur 3.10.b).

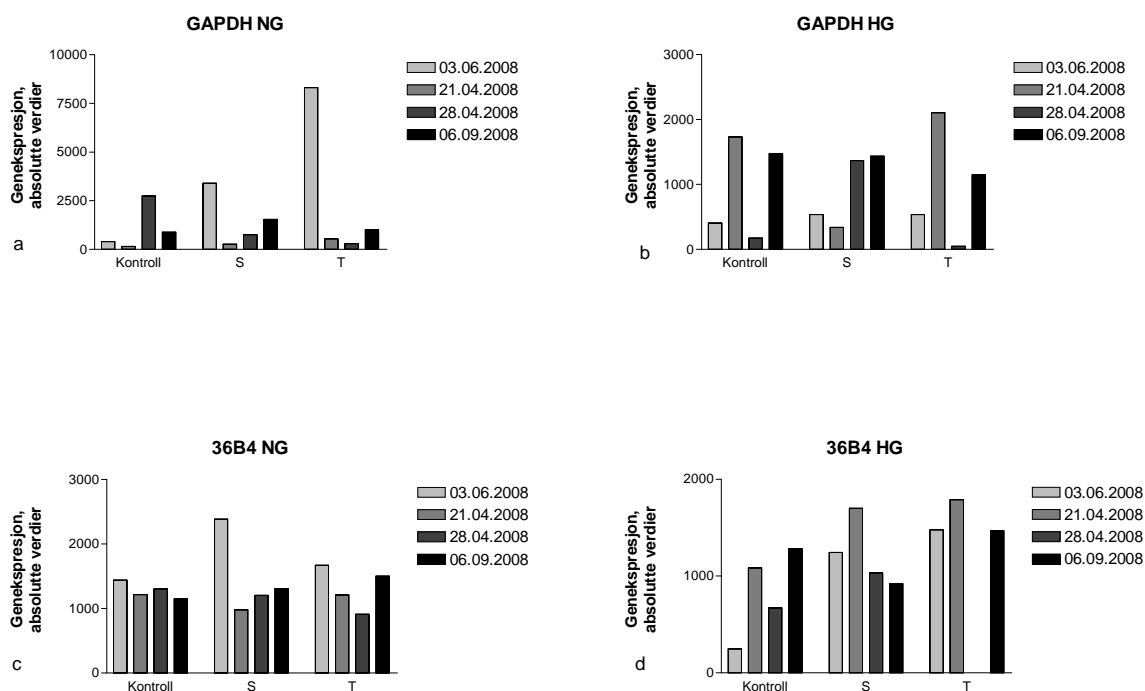
1 μM T0901317 og 5 μM 22(S)-HC tenderte til økt lipidakkumulering av OA ved NG, sammenliknet med kontrollen (figur 3.10.c). Ved HG så det ikke ut til at de to ligandene påvirket lipidakkumulering av OA. 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317, hemmet dens effekt ved NG, men ikke ved HG. 22(R)-HC påvirket ikke lipidakkumuleringen av OA, verken ved NG eller HG.

Figuren 3.10.d illustrerer hvor stor forskjell det var på lipidakkumulering ved henholdsvis acetat, PA og OA. Her er vist absolutte verdier for akkumuleringen til kontrollene (0.1% DMSO) for alle forsøkene ($n=3-4$). PA skilte seg klart ut når det gjaldt mengden lipider som ble akkumulert, sammenliknet med både OA og ikke minst acetat.

3.4 Real time PCR

Lever-X-reseptor er en transkripsjonsfaktor som regulerer en rekke gener involvert i metabolismen av kolesterol, lipider og karbohydrat. Humane muskelceller ble sådd ut på flasker som beskrevet i 2.2.2. Differensierte myotuber ble behandlet i 4 dager med 0.05% DMSO (kontroll), 5 μM 22(S)-HC (S) og 1 μM T0901317 (T) før total RNA ble isolert, revers transkribert og analysert ved real-time-PCR som beskrevet i 2.2.7.

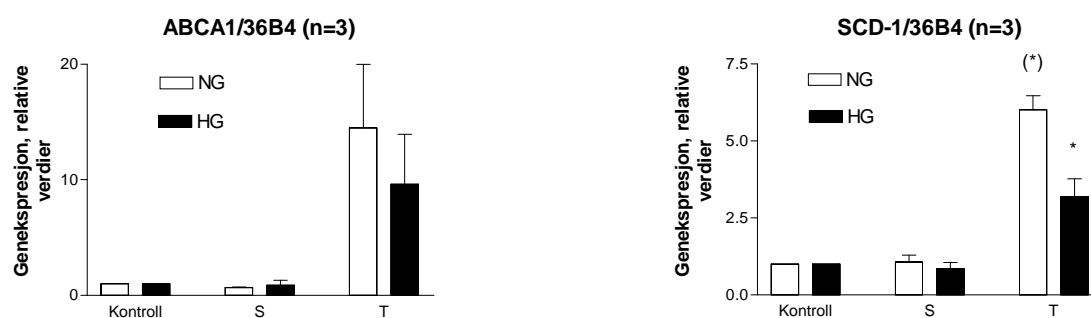
Som "housekeeping"-gener brukte vi både GAPDH og 36B4. GAPDH viste større variasjon i genekspressjonen enn 36B4 (figur 3.11.) og 36B4 ble derfor brukt for å normalisere resultatene.



Figur 3.11: Genekspresjon av referansegenene GAPDH og 36B4

Genekspresjon av GAPDH ved normoglykemi (NG) (a) og hyperglykemi (HG) (b) og tilsvarende for 36B4 (c og d). Differensierte myotuber ble forbehandlet i 4 dager med 0.05 % DMSO (kontroll), 5 μM 22(S)-HC (S) og 1 μM T0901317 (T) før total RNA ble isolert, revers transkribert og analysert ved real-time poly-chain-reaction (RT-PCR). Resultatene vises som absoluttverdier ($n = 4$). Dato angir forsøksdato.

Vi undersøkte LXR-regulering av genet ABCA1, som medierer effluks av kolesterol fra celler til apolipoproteiner, og SCD-1, et hastighetsregulerende enzym involvert i omdannelsen av monoumettede fettsyrer fra mettede fettsyrer.



Figur 3.12: Genekspresjon av ABCA1 og SCD-1

Differensierte myotuber ble forbehandlet i 4 dager som beskrevet i figur 3.11, før total RNA ble isolert, revers transkribert og analysert ved real-time poly-chain-reaction (RT-PCR). Resultatene er normalisert i forhold til 36B4 og vist som % av kontrollen \pm SEM ($n = 3$). * $p = 0.027$ versus kontroll, (*) $p = 0.052$ versus kontroll.

1 μM T0901317 ga økt genekspresjon av ABCA1, sammenliknet med kontrollen. Det var større effekt av T0901317 ved normoglykemi enn hyperglykemi. Tilsetning av 5 μM 22(S)-HC ga ingen økning av genekspresjonen av ABCA1, sammenliknet med kontrollen. Ingen av resultatene var statistisk signifikante ($p > 0,05$).

Tilsvarende resultater ble det for gjennomsnittet av tre forsøk med SCD-1. Tilsetning av 5 μM 22(S)-HC hadde ingen innvirkning på genekspresjonen av SCD-1, sammenliknet med kontrollen. 1 μM T0901317 ga signifikant økning av SCD-1 ved HG. Økningen ved NG er nær grensen for signifikans ($p = 0.052$) sammenliknet med kontrollen. Forskjellen mellom T0901317 ved NG og HG var ikke signifikant (figur 3.12).

4. Diskusjon

4.1 Dyrking av skjelettmuskelceller

Dyrking av cellekulturer har både fordeler og ulemper. En av de viktigste fordelene er kontrollen over det fysiokjemiske miljøet; pH, temperatur og CO₂-innholdet kan lett kontrolleres. Selv om mediene kan ha variasjoner fra batch til batch, lages det ofte så store mengder av gangen, at variasjonen blir liten mellom forsøkene. Forsøk med cellekulturer gjør det også mulig å studere en faktor av gangen, og man unngår mange interfererende faktorer som vil oppstå ved forsøk på dyr eller mennesker. Det kan måles direkte effekter med ulike behandlinger. Ulempen er at cellene er tatt ut av sitt tredimensjonale miljø, de mister spesifikke celle-celle-interaksjoner.

Cellekulturene mangler også de homeostatiske reguleringene fra nervesystemet og det endokrine systemet. Energimetabolismen *in vitro* foregår hovedsaklig via glykolyse og Krebs' syklus spiller en mindre rolle enn *in vivo* [45].

Protokollen som ble brukt for dyrking av satellittcellene, er basert på arbeidet til Gaster et al [39, 41]. De prøvde ut ulike proliferasjonsmedier, differensieringsmedier og identifiserte den optimale tidsperioden for forsøk med differensierte myotuber. Metoden er vel etablert og fungerte bra. Utsåing av celler på 96-brønners brett ble gjort med en celletetthet på 6-10 000 celler per brønn. For få celler gjør proliferasjonsfasen lengre, mens for høy tetthet gjør at cellene konkurrerer om næringssubstrater og kan dø av næringsmangel. Dyrking av celler på flasker krevde litt lengre tid før cellene kunne differensieres. Det skyldtes lavere celletetthet ved utsåing, og det tok lengre tid før cellene oppnådde 70-80 % konfluens.

Cellene som ble benyttet under forsøkene kommer alle fra friske frivillige forsøkspersoner. Av de åtte donorene som ble benyttet, var det én mann og resten kvinner. Gjennomsnittsalderen var 50 år. Fastende blodsukker var i gjennomsnitt 5.6 mmol/l, og det er innenfor normalområdet. Kun én kvinne hadde fastende blodsukker over 7 mmol/l (grenseverdien for diabetes), men det var kun en enkelt måling og det betyr ikke at hun hadde diabetes. Gjennomsnittlig KMI var på 24.5,

som tilsvarer normalvekt. To kvinner hadde KMI over 26 (overvektig), men begge var under 30 (fedme). Cellene fra de ulike donorene oppførte seg omtrent likt under forsøkene, både med hensyn til proliferasjonsperioden og under differensieringen. Vi så heller ingen morfologiske forskjeller på celler som ble dyrket under normoglykemiske forhold (5.5 mM glukose) eller hyperglykemiske forhold (20 mM glukose).

4.2 Oksidasjon og celleassosiasjon av fettsyrer

4.2.1 Celleassosiasjon av PA og OA

Opptak av fettsyrer i celler er i realiteten høyere enn det som måles som celleassosierte (CA) fettsyrer. En del av fettsyrene vil være oksidert til CO₂ i Krebs' syklus i mitokondriene, og en del vil være β-oksidasjonsprodukter fra lipidmetabolismen (syreløselige metabolitter, ASM) og gjenfinnes i forsøksmediet. Vi forsøkte å måle mengde ASM i mediet, men metoden fungerte ikke så godt. Når vi korrigerer for bakgrunnsaktivitet, fikk vi kun negative verdier.

Celler forbehandlet med T0901317 hadde økt mengde celleassosiert PA og OA sammenliknet med ubehandlede kontrollceller, både ved NG og HG. Økningen er signifikant for PA ved NG og HG, og for OA ved NG, når vi ser på de enkeltforsøk. Når vi ser på gjennomsnittet av forsøkene, ser vi også en økning av både celleassosiert PA og OA ved NG og HG etter forbehandling med T0901317, men økningene er ikke signifikante. Årsaken til dette er at det var stor spredning i dataene fra forsøk til forsøk. Det kunne vært benyttet en ikke-parametrisk signifikanstest siden antall observasjoner er små, men t-testen er robust hvis antall observasjoner i hver gruppe er lik og hvis dataene er normalfordelte [46]. Våre forsøk viste at i gjennomsnitt var det ingen signifikante forskjell på celleassosierte fettsyrer ved NG og HG, for noen av de LXR-ligandene som ble benyttet.

Gaster et al sine forsøk fra 2005 [47] med humane myotuber fra type 2-diabetikere og kontrollsubjekter, viste ingen forskjell på totalt opptak (CA + CO₂) av PA og OA. Det

var heller ingen forskjell ved basale forhold (5.5 mM glukose) og ved høy glukosekonsentrasjon (20 mM glukose). De fant imidlertid en forskjell på fordeling av fettsyrene intracellulært. PA akkumulerte som diacylglycerol (DAG) og triacylglycerol (TAG), mens OA akkumulerte mest som intracellulære frie fettsyrer (FFA).

Kase et al [31] sine forsøk på humane myotuber viste at celleassosiert mengde av PA økte etter behandling med 1 μ M T0901317, både for myotuber fra type 2-diabetikere og fra friske kontroller. Insulin økte opptaket av PA ytterligere for begge cellegruppene. Senere studier [48] med humane myotuber fra tre ulike type donorer (slanke personer, personer med fedme og personer med T2D) viste at for behandling med T0901317 økte celleassosiert mengde av PA, særlig hos myotuber fra fedme- og T2D-gruppen. Kombinasjonen 22(S)-HC + T0901317 reduserte effekten av T0901317 for celler fra slanke personer og personer med fedme. De observerte ingen effekt på celleassosiert PA etter behandling med 22(S)-HC eller 22(R)-HC (bortsett fra T2D-celler).

Forbehandling med den endogene LXR-agonisten 22(R)-HC ga i våre forsøk en varierende effekt på mengde celleassosiert fettsyrer. Ved NG ga 22(R)-HC signifikant økning av PA, men ikke av OA. Ved HG var det motsatt; 22(R)-HC ga en økt effekt på celleassosiert OA (ikke signifikant), men påvirket ikke celleassosiert PA.

22(S)-HC er en syntetisk LXR-ligand som har lik struktur som 22(R)-HC, bortsett fra konfigurasjonen i det stereogene senteret. Biologisk sett kan slike enantiomere oppføre seg helt ulikt, fordi interaksjoner med proteiner eller andre strukturer er tredimensjonale. Høyre hånd passer ikke i en venstre hanske, brukes ofte som metafor [49]. 22(S)-HC regnes som en LXR-antagonist [27]. Vi fant at forbehandling med 22(S)-HC kun ga en liten økning i CA for OA ved HG. Det mest interessante er likevel at 22(S)-HC hemmet effekten av T0901317 på CA når de ble gitt samtidig, jamfør Kase et al [48]. Dette gjaldt både for PA og OA, ved NG og HG. Nedsatt CA etter forbehandling med kombinasjonen T+S kan til dels også skyldes toksiske

effekter. Vi benyttet først 10 μM 22(S)-HC, men endret dette underveis til 5 μM . Vi så at kombinasjonen T + S ga i noen forsøk veldig lave proteinkonsentrasjoner (ikke vist) når det ble benyttet 10 μM 22(S)-HC i de innledende forsøkene. Det ble høyere proteinkonsentrasjoner (ikke vist) etter at vi senket konsentrasjonen av 22(S)-HC til 5 μM . I figurene som viser enkeltforsøk, er det benyttet 10 μM 22(S)-HC i kombinasjon med 1 μM T0901317 ved NG og HG. I figurene for gjennomsnittet av forsøkene er det benyttet 10 μM 22(S)-HC i ett forsøk og 5 μM 22(S)-HC i to forsøk, i kombinasjon med 1 μM T0901317.

4.2.2 Oksidasjon av PA og OA

I den postabsorptive fasen (faste) hos friske personer, bruker skjelettmuskulaturen hovedsaklig lipider som oksidativt substrat. Lipidoksidasjonen står for ca 80% av oksygenforbruket i muskel [50]. Hos personer med T2D eller fedme, er den oksidative kapasiteten til skjelettmuskulaturen redusert. I tillegg er evnen til å bytte til karbohydratoksidasjon som respons på insulin nedsatt [40]. Det er derfor interessant om forbehandling med LXR-ligander kan øke oksidasjonen av fettsyrer, målt som økt mengde CO_2 dannet under forsøket.

Vi fant at forbehandling med T0901317 resulterte i økt oksidasjonen av PA og OA sammenliknet med ubehandlede celler ved NG. Kun det ene forsøket med OA var signifikant. Ved HG hadde T0901317 ingen effekt på oksidasjonen av PA. For OA kan det sees en liten økning i oksidasjonen etter T0901317-behandling sammenliknet med ubehandlede kontrollceller, men spredningen er stor og det er ikke signifikant forskjell. Forbehandling med de to andre LXR-ligandene, 22(S)-HC og 22(R)-HC, ga signifikant økt oksidasjon av PA og OA ved NG i ett enkelt forsøk. Gjennomsnittet viser også økt oksidasjon av PA og OA, men da er det signifikans kun for 22(R)-HC for PA. Ved HG ble oksidasjonen av PA og OA redusert i forhold til kontrollcellene, etter behandling med 22(S)-HC og 22(R)-HC. Hyperglykemi kan redusere oksidasjonen av fettsyrer fordi hyperglykemi kan øke intracellulært innhold av malonyl-CoA. Malonyl-CoA hemmer enzymet CPT-1 som transporterer langkjedet

acyl-CoA over mitokondriemembranen [47]. 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317, reduserte dens effekt på oksidasjon av begge fettsyrene.

Kase et al [48] fant at oksidasjon av PA i myotuber fra personer med fedme (men ikke slanke personer), var økt etter behandling med T0901317, og at 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317 reduserte oksidasjonen av PA kun i celler fra T2D-donor.

Humane muskelbiopsier fra personer med fedme og insulinresistens har gitt innsikt i mekanismen for nedsatt oksidativ kapasitet i skjelettmuskelen. Karakteristisk er nedsatt antall mitokondrier, uvanlig morfologi til mitokondriene og lavere nivåer av enzymer i mitokondriene. Nedsatt oksidasjon kan forverre lipidakkumuleringen, særlig ved høye nivåer av frie fettsyrer i plasma. Forsøk på muskelceller fra rotte har vist at økt ekspresjon av et enzym i mitokondriene (CPT-1) ga økt β -oksidasjon. Økt oksidasjon ga en insulinsensitiverende effekt, uavhengig av endringer i lipidinnholdet i cellene [51]. Vi har ikke undersøkt om LXR-behandling påvirker insulinets effekt på lipidoksidasjon i skjelettmuskelceller, men det kunne vært et interessant forsøk. Vi har heller ikke gjort sammenliknende forsøk med muskelceller fra personer med fedme eller T2D, men funnene til Kase et al [48] kan tyde på økt oksidasjon av PA ved behandling med T0901317.

Økt opptak av fettsyrer i skjelettmuskulatur kan være ugunstig hvis de lagres som triglyserider (forverrer insulinresistensen), men gunstig hvis de forbrennes fullstendig til CO_2 fordi da bedres den metabolske insulinresponsen og dette beskytter mot fettsyreindusert insulinresistens [51]. Høy fraksjon ($\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$), betyr at en større andel av fettsyrer som ble tatt opp, ble forbrukt. Ved NG ble det varierende resultater, men det var en tendens til at T0901317 og 22(S)-HC har gunstig effekt for både PA og OA. Ved HG er fraksjonen av PA økt ved behandling med 22(S)-HC og 22(R)-HC, mens OA ikke viste økt fraksjon for noen av behandlingene.

4.3 Lipidfiltrasjon

Metoden som ble benyttet for å måle mengde celleassosierte radioaktive fettsyrer (CA), sier lite om hva som skjer med fettsyrene intracellulært. De kan enten forestres eller lagres som frie fettsyrer, eller de kan metaboliseres delvis eller fullstendig til CO₂ og danne energi i form av varme og ATP [44]. Lipidfiltrasjonsmetoden måler mengde akkumulerte radioaktive lipider i cellene. Lipidene i våre forsøk er enten syntetisert fra acetat, eller PA og OA er blitt forestret. Fra figur 3.10.d kan vi se at i ubehandlede celler, blir PA forestret i høyere grad enn OA. Dette stemmer godt overens med funnene til Gaster et al [47] der humane myotuber (ikke behandlet med LXR-ligander) akkumulerte PA som diacylglyserol (DAG) og triacylglyserol (TAG), mens OA akkumulerte mest som intracellulære frie fettsyrer. Det ble i liten grad syntetisert lipider fra acetat, men det kan muligens være for kort tid med 4 timers inkubering.

Figurene 3.5-3.7.a viser at behandling med T0901317 ga økt mengde celleassosiert PA. Lipidfiltrasjonsmetoden ga økt lipidakkumulering av PA etter samme behandling. Vi har ikke undersøkt hvilke typer lipider som er akkumulert, men tidligere studier har funnet at T0901317 medfører økt mengde triglyserider intracellulært hos mus og rotter, noe som er ugunstig blant annet med tanke på dysfunksjon av leveren og insulinresistens [25, 26]. Lipidfiltrasjonsmetoden ga ikke noe entydig svar på om 22(S)-HC kunne redusere lipidakkumuleringen av PA dersom det ble gitt samtidig med T0901317. 22(S)-HC gitt alene ga en liten økning i lipidakkumulering fra PA ved NG.

For OA var det kun 22(S)-HC og T0901317 (NG) som ga økt lipidakkumulering, men den akkumulerte mengden var betydelig lavere enn for PA sin del. OA er en umettet fettsyre som akkumuleres i skjelettmuskulatur i mindre grad enn den mettede fettsyren PA, og i tillegg blir OA akkumulert mest som frie fettsyrer [47]. Dette gjør at OA kanskje i mindre grad bidrar til insulinresistens enn PA gjør.

4.4 Genekspresjon

ABCA1 er en aktiv transportør av kolesterol, fosfolipider og andre lipofile molekyler over cellemembranen [21]. ABCA1 er involvert i revers kolesteroltransport og hemmer også opptak av kolesterol fra tarmen [21, 23]. Mutasjoner i genet som koder for transportøren kan gi Tangiers sykdom, der kolesterol akkumuleres i perifere vev og medfører prematur aterosklerose [17]. Mutasjoner kan også medføre HDL-mangel, som er assosiert med økt risiko for hjerte-karsykdommer [37]. I humane muskelceller fant vi at behandling med T0901317 ga økt genekspresjon av ABCA1. Behandling med 22(S)-HC ga ikke økt ekspresjon av ABCA1, dette samsvarer med det Kase et al [27] fant i 2006. Tidligere studier har vist at LXR/RXR-heterodimeren bindes til responselementer innen ABCA1 promotoren [21]. LXR-agonister kan også indusere gener som undertrykker inflammasjon i makrofager og hemmer proliferasjon av glatte muskelceller. Dette beskytter cellene mot utvikling av aterosklerose [37].

SCD-1 er det hastighetsbegrensende enzymet i syntesen av monoumettede fettsyrer fra mettede fettsyrer, et viktig trinn i triglyseridsyntesen. Ved T2D er aktiviteten til SCD økt, sannsynligvis som respons på økt insulinivå. SCD kan derfor bidra til hyperlipidemi ved T2D [35]. LXR-agonister kan øke lipogenesis indirekte ved å øke transkripsjonen av SREBP-1c (som induserer lipogene enzymer), eller direkte ved å øke transkripsjonen av blant annet SCD-1 [17]. Våre forsøk fant at ekspresjonen til SCD-1 ble økt etter behandling med T0901317 og kan således forklare den økte lipidakkumuleringen vi fant ved lipidfiltrasjonsmetoden. Forsøk på mus hvor LXR α er ”knocket” ut, har vist at LXR $\alpha^{-/-}$ mus ikke får økt ekspresjon av SREBP-1, ACC, FAS og SCD-1 i leveren etter behandling med T0901317, og at basalnivåene er redusert. Dette tyder på at LXR α -isoformen er ansvarlig for de uønskede lipogene effektene av T0901317 [17].

4.5 Normoglykemi versus hyperglykemi

Funnene til Mitro et al [18] hvor D-glukose og D-glukose-6-fosfat aktiverer LXR α og LXR β og induserer ekspresjonen av LXR målgener, var årsaken til at vi ønsket å undersøke om det var forskjell i effekter av LXR-aktivering på lipidmetabolismen ved NG (5.5 mM glukose) og HG (20 mM glukose).

Denne studien ble senere kritisert [52, 53], blant annet fordi HepG2 celler som Mitro et al benyttet [18] responderer dårlig på glukose og at glukose-6-fosfat ikke kan transporteres fra medium og inn i cellen. I tillegg er glukose mer hydrofil enn de andre kjente LXR-ligandene og strukturen til bindingsstedet var ukjent. Det ble også stilt spørsmål om i hvilken grad LXR bidrar til glukoseregulert genekspressjon sammenliknet med andre kjente mekanismer som for eksempel transkripsjonsfaktoren ChREBP og insulin. Forsøkene til Denechaud et al [53] i LXR α/β "knockout"-mus sammenliknet med villtype-mus, indikerer at glukosemediert aktivering av ChREBP skjer via en mekanisme som er uavhengig av LXR. Forsøkene deres klarte ikke å gjenskape at glukose fremmer binding av koaktivatorer til LXR, og de konkluderte med at LXR ikke har en rolle i å detektere glukosenivået i lever.

Forsøkene vi har gjort på celleassosierte fettsyrer, oksidasjonen av fettsyrer, lipidakkumulering og genekspressjonen av ABCA1 og SCD-1, viste ingen signifikante forskjeller etter forbehandling med T0901317, 22(S)-HC eller 22(R)-HC ved NG og HG. Vi har imidlertid ikke undersøkt om cellene tok opp mer av den ekstra glukosen som var tilsatt differensieringsmediet ved HG. Det kunne vært interessant å undersøke om glukosen forble i mediet eller om cellene aktivt tok opp og forbrukte glukosen.

Selv om det ikke var signifikante forskjeller ved NG og HG kan vi se en tendens til at ubehandlede celler fikk økt celleassosiert mengde PA og økt oksidasjon av PA ved HG i forhold til NG. Et tilsvarende mønster fikk vi ikke for OA.

Genekspressjonsforsøkene viste en tendens til at forbehandling med T0901317 ga høyere ekspresjon av ABCA1 og SCD-1 ved NG i forhold til HG.

4.6 Hva kan LXR-ligander brukes til?

De mulige terapeutiske bruksområdene til LXR-agonister og LXR-antagonister er mange og reflekterer den utbredte ekspresjonen av reseptorene i ulike vev i kroppen. I en todelt oversiktsartikkel [17, 54] fra 2007, er det et spenn fra kreft, Alzheimers sykdom, astma, allergi og aterosklerose til diabetes og hypertriglyseridemi som mulige sykdommer som kan påvirkes av behandling med LXR-ligander.

De fleste studiene med LXR-ligander er imidlertid utført på mus og rotter og langtidsvirkningene er ukjente. Studier på gnagere kan ikke umiddelbart overføres til mennesker, da både genekspresjonen og reguleringen kan være forskjellig. De syntetiske ligandene som er brukt i forsøkene er i tillegg mer potente enn endogene ligander og har heller ikke identiske effekter [54].

I forhold til T2D og fedme er det noen effekter av LXR-agonister som er gunstige og noen som ikke er det. T0901317 senker plasmaglukose, bedrer insulinsensitiviteten og øker syntese av insulin [28, 29, 32], noe som er gunstig ved insulinresistens. Den økte lipogenesisen og triglyseridakkumuleringen etter behandling med T0901317 er uønsket. Ulike studier har vist at LXR α er ansvarlig for økt lipogenese, mens aktivering av LXR β ikke gir økte triglyseridnivåer hos mus, så en utfordring kan være å lage et molekyl som er selektiv for LXR β [37].

5. Oppsummering og konklusjon

Dyrking av skjelettmuskelceller er en relativ enkel *in vitro* metode der man kan studere enkeltfaktorer i cellulær metabolisme. Vi har studert hvordan ulike LXR-ligander har påvirket lipidmetabolismen av palmitinsyre, oljesyre og acetat i humane myotuber ved normoglykemi og hyperglykemi. Vi har også sett på om celler forbehandlet med T0901317 og 22(S)-HC påvirket genekspressjonen av to viktige gener, ABCA1 og SCD-1 i henholdsvis kolesterol- og lipidmetabolismen.

Forbehandling med T0901317 ga økt mengde av celleassosiert, radioaktiv PA og OA, og økte oksidasjonen av fettsyrene ved NG. Fraksjonen var også økt. Celler forbehandlet med T0901317 fikk økt lipidakkumulering fra acetat, PA og OA (kun ved NG), og ekspresjonen av SCD-1 og ABCA1 økte. Den økte lipogenesen og triglyseridakkumuleringen etter behandling med T0901317 er uønsket.

Celler forbehandlet med 22(S)-HC alene fikk økt mengde celleassosiert OA (ved HG) og økt oksidasjon av PA og OA (ved NG). Lipidakkumulering av PA og OA (ved NG) økte etter samme behandling. 22(S)-HC gitt samtidig med T0901317 reduserte dens effekt på celleassosierte fettsyrer, oksidasjonen av fettsyrene og lipidakkumulering fra OA (ved NG).

Forbehandling med 22(R)-HC ga økt mengde CA av PA (ved NG) og OA (ved HG), økt oksidasjon av fettsyrene ved NG og nedsatt oksidasjon av fettsyrene ved HG. 22(R)-HC påvirket ikke lipidakkumulering fra acetat, PA eller OA.

Selv om det ikke var signifikante forskjeller ved NG og HG kan vi se en tendens til at ubehandlede celler fikk økt celleassosiert mengde PA og økt oksidasjon av PA ved HG i forhold til NG. Et tilsvarende mønster fikk vi ikke for OA.

Genekspressjonsforsøkene viste en tendens til at forbehandling med T0901317 ga høyere ekspresjon av ABCA1 og SCD-1 ved NG i forhold til HG.

Kildeliste

1. Norges Diabetesforbund. *Fakta om diabetes*. 2008, 2. september [cited 2008, 16. oktober]; Available from: <http://www.diabetes.no/index.asp?id=23023>.
2. WHO, T.W.H.O. *Fact sheet N°312, Diabetes*. 2006 September [cited 2008, 16. oktober]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>
3. Rang, H.P., *Pharmacology*. 5th ed. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone. XII, 797 s.
4. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. *Lancet*, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
5. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
6. Weickert, M.O. and A.F. Pfeiffer, *Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism*. *Diabetologia*, 2006. **49**(8): p. 1732-41.
7. Qureshi, K. and G.A. Abrams, *Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(26): p. 3540-53.
8. Montecucco, F., S. Steffens, and F. Mach, *Insulin resistance: a proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability*. *Mediators Inflamm*, 2008. **2008**: p. 767623.
9. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2007*.
10. Koutsari, C. and M.D. Jensen, *Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(8): p. 1643-50.
11. Martyn, J.A., M. Kaneki, and S. Yasuhara, *Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms*. *Anesthesiology*, 2008. **109**(1): p. 137-48.
12. Kasuga, M., *Insulin resistance and pancreatic beta cell failure*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1756-60.
13. Lazar, M.A., *How obesity causes diabetes: not a tall tale*. *Science*, 2005. **307**(5708): p. 373-5.
14. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. *Cell*, 1995. **83**(6): p. 835-9.
15. Makishima, M., *Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors*. *J Pharmacol Sci*, 2005. **97**(2): p. 177-83.
16. Chen, M., S. Beaven, and P. Tontonoz, *Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(12): p. 2570-9.
17. Wojcicka, G., et al., *Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007. **61**: p. 736-59.

18. Mitro, N., et al., *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. *Nature*, 2007. **445**(7124): p. 219-23.
19. Edwards, P.A., M.A. Kennedy, and P.A. Mak, *LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis*. *Vascul Pharmacol*, 2002. **38**(4): p. 249-56.
20. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 2002, New York: Garland Science. XXXIV, 1463, [86] s.
21. Oram, J.F., *HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 720-7.
22. Fayard, E., K. Schoonjans, and J. Auwerx, *Xol INXS: role of the liver X and the farnesol X receptors*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(2): p. 113-20.
23. Tontonoz, P. and D.J. Mangelsdorf, *Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(6): p. 985-93.
24. Sabol, S.L., H.B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo, *The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(10): p. 2151-67.
25. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
26. Chisholm, J.W., et al., *The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(11): p. 2039-48.
27. Kase, E.T., et al., *22-Hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(12): p. 1515-22.
28. Stulnig, T.M., et al., *Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(6): p. 1299-305.
29. Cao, G., et al., *Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(2): p. 1131-6.
30. Dalen, K.T., et al., *Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(48): p. 48283-91.
31. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 1108-15.
32. Efanov, A.M., et al., *Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 3**: p. S75-8.
33. Stulnig, T.M., et al., *Liver X receptors downregulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity*. *Diabetes*, 2002. **51**(8): p. 2426-33.
34. Joseph, S.B., et al., *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(2): p. 213-9.
35. Steffensen, K.R. and J.A. Gustafsson, *Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR)*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S36-42.
36. Barish, G.D., *Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in atherosclerosis and immunity*. *J Nutr*, 2006. **136**(3): p. 690-4.

37. Nomiya, T. and D. Bruemmer, *Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2008. **10**(1): p. 88-95.
38. Zammit, P.S., T.A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, *The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold*. *J Histochem Cytochem*, 2006. **54**(11): p. 1177-91.
39. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *Apmis*, 2001. **109**(11): p. 735-44.
40. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1934-41.
41. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. *Apmis*, 2001. **109**(11): p. 726-34.
42. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(4): p. 961-7.
43. Simonian, M.H. and J.A. Smith, *Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2006. **Chapter 10**: p. Unit 10 1A.
44. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. *Acta Physiol Scand*, 2005. **183**(1): p. 31-41.
45. Freshney, R.I., *Culture of animal cells a manual of basic technique*. 4th ed. 2000, New York: Wiley-Liss. XXV, 577 s.
46. Moore, D.S. and G.P. McCabe, *Introduction to the practice of statistics*. 4th ed. 2003, New York: Freeman. XXV, 828, [81] s.
47. Gaster, M., A.C. Rustan, and H. Beck-Nielsen, *Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes*. *Diabetes*, 2005. **54**(3): p. 648-56.
48. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals*. *Diabetologia*, 2007. **50**(10): p. 2171-80.
49. Lehninger, A.L., M.M. Cox, and D.L. Nelson, *Principles of biochemistry*. 2nd ed. 1993, New York: Worth. XLI, 1013 s.
50. Kelley, D.E. and J.A. Simoneau, *Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(6): p. 2349-56.
51. Perdomo, G., et al., *Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(26): p. 27177-86.
52. Lazar, M.A. and T.M. Willson, *Sweet dreams for LXR*. *Cell Metab*, 2007. **5**(3): p. 159-61.
53. Denechaud, P.D., et al., *ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(3): p. 956-64.

-
54. Jamroz-Wisniewska, A., et al., *Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2007. **61**: p. 760-85.

Vedlegg

Utsåingsmedium (M1)

500 ml Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM) m/GLUTAMAX-I

50 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2.5 ml Penicillin/Streptomycin 10 000 units/ ml

2.5 ml Fungizone® (250 µg/ml amphotericin)

Proliferasjonsmedium (M2)

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I

10 ml FCS

10 ml Ultrosor G

2.5 ml Penicillin/Streptomycin 10 000 units/ ml

2.5 ml Fungizone

Differensieringsmedium (M3)

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I

10 ml FCS

2.5 ml Penicillin/ Streptomycin 10 000 units/ ml

2.5 ml Fungizone

25 pmol insulin (21 µl av 1000 ganger fortynning av Insulin Actrapid® Penfill 0,6 mM)

Forsøksmedium I (M4)

Isotopmerket PA eller OA (1µCi/ml) 18µM

Umerket PA eller OA 82µM

L-carnitin 1mM

Bovint serum albumin (BSA) 7.2 µM

Dulbecco`s phosphate- buffered saline (DPBS) m/Hepes

Forsøksmedium II (M5)

Isotopmerket PA, OA eller acetat (1 μ Ci/ml)

Umerket PA, OA eller acetat ad 100 μ M

L-carnitin 1mM

Differensieringsmedium (M3)

Høstebuffer- PBS buffer (B1)

8 g NaCl

0.2 g KH₂PO₄

2.9g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0.2 g KCl

destillert vann til 1 liter

pH justeres til 7.2-7.4

Reaksjonsblanding til cDNA syntese (M6)

DEPC-dH₂O + prøve 7.7 μ l*

10 x Taq Man Rt buffer 2.0 μ l

25 mM MgCl₂ 4.4 μ l

10 mM dNTP mix 4.0 μ l

50 μ M Random hexamers 1.0 μ l

RNase inhibitor (20 U/ μ l) 0.4 μ l

Multiscribe Reverse Transcriptase

(50 U/ μ l) 0.5 μ l

12.3 μ l

* 2 μ g totRNA og DEPC-dH₂O til totalt volum 20 μ l. (Negativ kontroll har erstattet revers transkriptase med DEPC-dH₂O)

Reaksjonsblanding til RT-PCR (M7)

SYBR green mix	12.5 μ l
Primer forward	0.25 μ l
Primer revers	0.25 μ l
DEPC-dH ₂ O	<u>9.5 μl</u>
	22.5 μ l

Hver brønn tilsettes 2,5 μ l fortynnet cDNA (1:10 for housekeeping gener, 1:5 for andre gener) eller standard + 22.5 μ l PCR- blanding